(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2011 年 11 月 24 日 (24.11.2011)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2011/145615 A1

(51) 国際特許分類：
C12N 15/09 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01) C07K 19/00 (2006.01)
A61K 35/12 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2011/061311

(22) 国際出願日： 2011 年 5 月 17 日 (17.05.2011)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2010-113806 2010 年 5 月 18 日 (18.05.2010) JP
特願 2010-289192 2010 年 12 月 27 日 (27.12.2010) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について)：タカラバイオ株式会社 (TAKARA BIO INC.) [JP/JP]; 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 Shiga (JP).

( ) 発明者；および
( ) 発明者/出願人 (米国についてのみ)：檜 竜嗣 (ENOKI, Tatsuji) [JP/JP]; 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社内 Shiga (JP). 西江 敏和 (NISHIE, Toshikazu) [JP/JP]; 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社内 Shiga (JP). 円居 隆宏 (MARUI, Takahiro) [JP/JP]; 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社内 Shiga (JP). 高島 扶有子 (TAKASHIMA, Fuyuko) [JP/JP]; 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社内 Shiga (JP). 峰野 純一 (MINENO, Junichi) [JP/JP]; 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社内 Shiga (JP).

(74) 代理人：田中 光雄，外 (TANAKA, Mitsuo et al.); 〒5400001 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMP ビル青山特許事務所 Osaka (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能)：AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

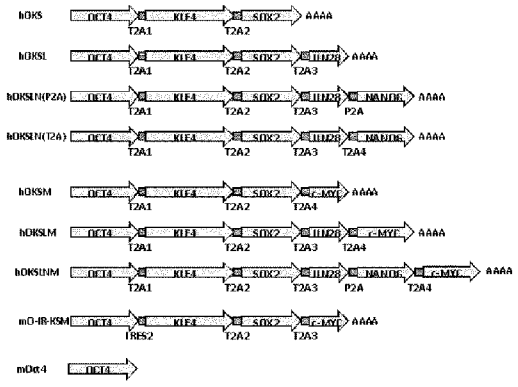
(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能)：ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW,

[続葉有]

(54) Title: NUCLEIC ACID FOR PRODUCTION OF PLURIPOTENT STEM CELL

(54) 発明の名称：多能性幹細胞の製造のための核酸

[図4]



(57) Abstract: The purposes of the present invention are to provide a method for efficiently producing pluripotent stem cells and to promote the study and use of the pluripotent stem cells. Specifically disclosed are: a nucleic acid which contains coding regions of genes that respectively encode six nuclear reprogramming factors OCT4, KLF4, SOX2, LIN28, NANOG and a protein belonging to the MYC family, said coding regions being linked to one another through sequences encoding self-cleaving peptides; a set of (a) a nucleic acid which contains regions that are selected fiOm among coding regions of genes that respectively encode six nuclear reprogramming factors OCT4, KLF4, SOX2, LIN28, NANOG and a protein belonging to the MYC family, said regions being linked to one another through IRES sequences or sequences encoding self-cleaving peptides and (b) another nucleic acid wmch contains a coding region of a gene that encodes OCT4; and a set of vectors which respectively comprise the nucleic acids.

(57) 要約：

[続葉有]

WO 2011/145615 A1

MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

本発明は、多能性幹細胞を効率よく製造するための方法を提供し、当該細胞の研究ならびに利用を促進することを課題とする。本発明は、相互に自己切断ペプチドをコードする配列を介して接続されたＯＣＴ４、ＫＬＦ４、ＳＯＸ２、ＬＩＮ２８、ＮＡＮＯＧ及びＭＹＣファミリーに属するタンパク質の６種の核初期化因子をコードする遺伝子のコード領域を含む核酸、又は (ａ) 相互に自己切断ペプチドをコードする配列又はＩＲＥＳ配列を介して接続されたＯＣＴ４、ＫＬＦ４、ＳＯＸ２、ＬＩＮ２８、ＮＡＮＯＧ及びＭＹＣファミリーに属するタンパク質の６種の核初期化因子をコードする遺伝子のコード領域から選択された領域を含む核酸、及び (ｂ) ＯＣＴ４をコードする遺伝子のコード領域を含む他の核酸、そして当該核酸を含むベクターのセットを提供する。

明 細 書

発明の名称 :多能性幹細胞の製造のための核酸

技術分野

[0001] 本発明は、種々の細胞への分化能力を保持した多能性幹細胞 (pluripotent stem cell) をより効率よく製造するための核酸及び当該核酸を使用する多能性幹細胞の効率のよい製造方法に関する。

背景技術

[0002] 生物体のすべての細胞系列に分化可能な多能性幹細胞は、任意のタイプの細胞に分化し、また、任意のタイプの組織又は器官等を生みだす潜在的能力を有している。そのため、当該細胞を使用して、生物体において失われた細胞を再生し補うという新しい治療法 (再生医療) に応用することが期待されている。更に、発生学、分子生物学、薬学分野における研究ツールとしても利用可能性を有している。

[0003] 多能性幹細胞として、胚盤胞と呼ばれる段階の初期胚のうちの内部細胞塊から樹立される細胞株である胚性幹細胞 (embryonic stem cell:ES細胞) が知られている。しかしながら、ヒト胚を破壊して作製されるヒトES細胞は倫理的観点からの反対も多く、その研究が制限されるケースも少なくない。

[0004] これらES細胞の問題点を解消するため、胚を使用することなく体細胞に人為的に遺伝子を導入して誘導される細胞株である多能性幹細胞 (誘導多能性幹細胞 :induced piuripotent stem cell :iPS細胞 :例えば非特許文献1) が開発された。当該細胞は細胞の全能性の獲得や維持に関与する遺伝子を人為的に体細胞に導入することにより作製される。現在、その作製手法、利用方法に関して、盛んに研究が進められている。

[0005] 前記の非特許文献1にはOCT4、SOX2、c_M1Y○及びペ1「4の4種のポリペプチドをそれぞれコードする遺伝子を導入し、これらポリペプ

チドを細胞内で個別に発現させることによってヒトiPS細胞を作製する方法が開示されている。また、他の研究者からはOCT4、SOX2、NANOG及びLIN28の4種のポリペプチドをコードする遺伝子を用いた同様の操作によってヒトiPS細胞を作製したとの報告がなされている(非特許文献2)。しかしこれらの遺伝子を導入されたすべての体細胞がiPS細胞に誘導されることはなく、実際にはその一部のみ(総細胞数の0.02%以下)力《iPS細胞へと誘導されるに過ぎない。本発明者らは先に、相互に自己切断ペプチドをコードする配列を介して接続されたOCT4、KLF4、SOX2、LIN28、NANOGの5種の核初期化因子をコードする遺伝子のコード領域を含む核酸を含有するベクターを開発し、iPS細胞誘導効率の改善に成功した。その一方で、本発明者らは核初期化因子をコードする遺伝子の組合わせによりiPS細胞誘導効率が変化することを確認している。また、複数の核初期化因子をコードする遺伝子を保持するベクターでは、前記遺伝子の配置(並び順)によりiPS細胞誘導効率が変化することが報告されている(非特許文献3)。更に、従来報告されているベクターを使用してもiPS細胞誘導の材料とする細胞の種類によっては高い効率でのiPS細胞の取得に困難な場合がある。このように、未だ細胞研究用や臨床研究用のiPS細胞作製技術は十分に確立したとはいえない状況にある。

先行技術文献

非特許文献

[0006] 非特許文献1:セル(Cell)、第131巻、861—872頁、2007年

非特許文献2:サイエンス(Science)、第318巻、1917—1920頁、2007年

非特許文献3:サイエンス(Science)、第322巻、949—953頁、2008年

発明の概要

発明が解決しょうとする課題

[0007] 多能性幹細胞の利用を図るためには、当該細胞を更に効率よく製造する手法の開発が急務である。本発明の目的は、多能性幹細胞をより効率よく製造するための方法を提供し、当該細胞の研究ならびに利用を促進することにある。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意努力した結果、多くの核初期化因子の候補の中から、研究やその他の用途に適したＥＳ細胞様の細胞を効率よく安定して製造できる核初期化因子の組合せを見出し、本発明を完成させた。

[0009] すなわち本発明を概説すれば、

[１] 相互に自己切断ペプチドをコードする配列を介して接続されたＯＣＴ４、ＫＬＦ４、ＳＯＸ２、ＬＩＮ２８、ＮＡＮＯＧ及びＭＹＣファミリーに属するタンパク質の６種の核初期化因子をコードする遺伝子のコード領域を含む核酸、

[２] 5' 末端より順にＯＣＴ４、ＫＬＦ４、ＳＯＸ２、ＬＩＮ２８、ＮＡＮＯＧ、ＭＹＣフアミリーに属するタンパク質のそれぞれの遺伝子のコード領域が並んで配置されている [１] 記載の核酸、

[３] [１] 又は [２] に記載の核酸を含むベクター、

[４] (１) ＯＣＴ４、ＫＬＦ４、ＳＯＸ２、ＬＩＮ２８、ＮＡＮＯＧ及びＭＹＣファミリーに属するタンパク質からなる群より選択される少なくとも３種の核初期化因子をコードする遺伝子のコード領域を１つの分子内に含む核酸、及び

(２) ＯＣＴ４をコードする遺伝子のコード領域を含む他の核酸、

を含む核酸のセット、

[５] (１) の核酸が、少なくとも3種の核初期化因子をコードする遺伝子のコード領域が、自己切断ペプチドをコードする配列及びＩＲＥＳ (ｉｎｔｅｒｎａｌ ｒｉｂｏｓｏｍａｌ ｅｎｔｒｙ ｓｉｔｅ) 配列から選択さ

れる配列を介して相互に接続された核酸である、[4]に記載の核酸のセット、

[6] (1)の核酸において、少なくとも3種の核初期化因子をコードする遺伝子のコード領域のうち、5'末端の2種のコード領域が順にＯＣＴ４、ＫＬＦ４をコードする遺伝子のコード領域であり、それらがＩＲＥＳ配列を介して接続されている、[4]又は[5]に記載の核酸のセット、

[7] [4]～[6]のいずれか1項に記載の核酸のセットを構成する核酸をそれぞれ含む2種のベクターからなるベクターのセット、

[8] [1]に記載の核酸又は[4]に記載の核酸のセットを含む細胞、

[9] 体細胞に[1]に記載の核酸又は[4]に記載の核酸のセットを導入する工程を包含することを特徴とする、多能性幹細胞の製造方法、

[10] ベクターを使用して核酸又は核酸のセットを体細胞に導入する[9]記載の多能性幹細胞の製造方法、

[11] 核酸又は核酸のセットを導入する工程がフイブロネクチン又はフィブロネクチンフラグメントの存在下に実施される[9]記載の方法、

[12] 体細胞に[3]に記載のベクター又は[7]に記載のベクターのセットを導入して多能性幹細胞を製造する工程、及び前記の多能性幹細胞の分化を誘導する工程、を包含することを特徴とする、分化細胞の製造方法、

に関する。

発明の効果

[0010] 本発明の核酸、ベクター、核酸のセット、又はベクターのセットを使用することにより多能性幹細胞をより効率よく製造することが可能であり、当該多能性幹細胞は所望の細胞への分化能を有しており、基礎研究、医療開発研究への応用研究において極めて有用である。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]実施例において作製した多能性幹細胞のマーカー遺伝子の発現を示す図である。

[図2]実施例において作製した多能性幹細胞の細胞表面マーカーの発現を示す

図である。

[図3]実施例において作製した多能性幹細胞の多分化能を示す図である。

[図4]実施例において作製した核酸の構造を示す図である。

発明を実施するための形態

[0012] 以下に本発明について詳細に説明する。

[0013] 本明細書において「核初期化因子」とは、ＥＳ細胞などで発現している分化、発生又は増殖などに関係する因子のうち、核の初期化（リプログラミング）に関与する因子を意味する。核初期化因子となる候補は多数報告されている。例えば、セル（Ｃｅｌ１）、第１２６巻、６６３—６７６頁、２００６年には、２４種の核初期化因子の候補が記載されている。非特許文献２には、１４種の核初期化因子の候補が記載されている。

[0014] 本発明に使用される核初期化因子をコードする遺伝子のコード領域は、ＮＣＢＩ（米国国立バイオテクノロジー情報センター）の登録情報からその塩基配列を入手することができる。当業者は登録情報に含まれる塩基配列から、核初期化因子の成熟タンパク質又はプレプロタンパク質のＮ末端からＣ末端をコードする塩基配列を入手することができる。次に、前記塩基配列に基づいてプライマーを設計し、ヒトｃＤＮＡライブラリーを鋳型としてＰＣＲなどにより核初期化因子をコードするＤＮＡフラグメントを調製することができる。

[0015] 本発明に使用される核初期化因子をコードする遺伝子のコード領域には、野生型遺伝子のコード領域が使用できる。更に、前記核初期化因子には複数の変異型（バリアント）の存在が報告されており、これらの変異型遺伝子のコード領域も本発明に使用できる。野生型遺伝子のコード領域の塩基配列に人為的に数個、好ましくは１～９個、より好ましくは１～６個の塩基が置換、欠失、付加又は挿入された塩基配列であって、野生型がコードする核初期化因子と同様の機能を有するポリペプチドをコードする塩基配列も使用できる。あるいは、変異型遺伝子は、例えば配列比較プログラムＢＬＡＳＴをデフォルト設定で用いてその配列を元の配列と比較したとき、配列同一性が少

なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％であることを意味していてもよい。

[001 6] ＯＣＴ４は、ＰＯＵファミリーに属する転写因子で、多能性の維持、未分化マーカーとして報告されている。本発明に使用されるヒトＯＣＴ４をコードする遺伝子のコード領域は、ＲｅｆＳｅｑ Ａｃｃ．Ｎｏ．ＮＭ―００２７０１．４に示される。例えば、ヒトＯＣＴ４をコードする遺伝子のコード領域は、配列番号１３の塩基番号１４０５～２４８４に示される塩基配列である。本発明に使用されるマウスＯＣＴ４をコードする遺伝子のコード領域は、ＲｅｆＳｅｑ Ａｃｃ．Ｎｏ．ＮＭ―０１３６３３に示される。例えば、マウスＯＣＴ４をコードする遺伝子のコード領域は、配列番号１０の塩基番号１３９６～２４５１に示される塩基配列である。

また、マウスＯＣＴ４をコードする遺伝子のコード領域には、ｍＲＮＡの分解と翻訳の阻害によって標的遺伝子の発現を抑制するマイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）であるｍｉＲ_４７０の標的配列が存在し、分化した細胞においてこれらの標的遺伝子の発現を抑制している。これらのｍｉＲＮＡ標的配列はヒトＯＣＴ４をコードする遺伝子においても保存されていることが報告されている。遺伝子導入後にｍｉＲＮＡによる発現阻害が起こることを防ぐためにＯＣＴ４をコードする遺伝子のコード領域に変異を導入してもよい。

[001 7] ＫＬＦ４は、腫瘍抑制因子又は発癌因子として機能する転写因子である。本発明に使用されるヒトＫＬＦ４をコードする遺伝子のコード領域は、ＲｅｆＳｅｑ Ａｃｃ．Ｎｏ．ＮＭ―００４２３５．３に示される。例えば、ヒトＫＬＦ４をコードする遺伝子のコード領域は、配列番号１３の塩基番号２５５１～３９６０に示される塩基配列である。本発明に使用されるマウスＫＬＦ４をコードする遺伝子のコード領域は、ＲｅｆＳｅｑ Ａｃｃ．Ｎｏ．ＮＭ―０１０６３７に示される。例えば、マウスＫＬＦ４をコードする遺伝子のコード領域は、配列番号１０の塩基番号２５１８～３９６６に示される塩基配列である。

[001 8] ＳＯＸ２は、Ｓｏｘ（ＳＲＹ_ｒｅｌａｔｅｄ ＨＭＧ ｂｏｘ）遺伝子

ファミリーに属し、ＤＮＡ結合能を持つＨＭＧドメインと転写活性化ドメインから成る転写因子である。本発明に使用されるヒトＳＯＸ２をコードする遺伝子のコード領域は、ＲｅｆＳｅｑ　Ａｃｃ．Ｎｏ．ＮＭ_0　０３１０６．２に示される。例えば、ヒトＳＯＸ２をコードする遺伝子のコード領域は、配列番号１３の塩基番号４０２７～４９７７に示される塩基配列である。本発明に使用される、マウスＳＯＸ２をコードする遺伝子のコード領域は、ＲｅｆＳｅｑ　Ａｃｃ．Ｎｏ．ＮＭ—０１１４４３に示される。例えば、マウスＳＯＸ２をコードする遺伝子のコード領域は、配列番号１０の塩基番号４０５１～５００７に示される塩基配列である。

また、マウスＳＯＸ２をコードする遺伝子のコード領域には、前記ＯＣＴ４をコードする遺伝子と同様にｍｉＲ-１３４の標的配列が存在する。遺伝子導入後にｍｉＲＮＡによる発現阻害が起こることを防ぐためにＳＯＸ２をコードする遺伝子のコード領域に変異を導入してもよい。

[001 9] ＬＩＮ２８は、選択的にｌｅｔ_７ｍｉＲＮＡプロセシングを抑制するＲＮＡ結合タンパク質である。本発明に使用されるヒトＬＩＮ２８をコードする遺伝子のコード領域は、ＲｅｆＳｅｑ　Ａｃｃ．Ｎｏ．ＮＭ—０２４６７４．４に示される。例えば、ヒトＬＩＮ２８遺伝子のコード領域は、配列番号１２の塩基番号５０４４～５６７０に示される塩基配列である。本発明に使用されるマウスＬＩＮ２８をコードする遺伝子のコード領域は、ＲｅｆＳｅｑ　Ａｃｃ．Ｎｏ．ＮＭ—１４５８３３に示される。

[0020] ＮＡＮＯＧは、ホメォボックス転写因子である。本発明に使用されるヒトＮＡＮＯＧをコードする遺伝子のコード領域は、ＲｅｆＳｅｑ　Ａｃｃ．Ｎｏ．ＮＭ—０２４８６５．２に示される。例えば、ヒトＮＡＮＯＧをコードする遺伝子のコード領域は、配列番号１２の塩基番号５７４３～６６５７に示される塩基配列である。本発明に使用されるマウスＮＡＮＯＧをコードする遺伝子のコード領域は、ＲｅｆＳｅｑ　Ａｃｃ．Ｎｏ．ＸＭ_１３２７５５に示される。

[0021] 本発明で使用されるＭＹＣファミリーに属するタンパク質をコードする遺

伝子は、ｃ―ＭＹＣをコードする遺伝子、Ｎ―ＭＹＣをコードする遺伝子、Ｌ―ＭＹＣをコードする遺伝子が含まれる[ジャーナル　オブ　セル　サイエンス（Ｊ　Ｃｅｌｌ　Ｓｃｉ）、第１１９巻、２０８―２１６頁、２００６年]。

例えば、ヒトｃ―ＭＹＣをコードする遺伝子のコード領域は、ＲｅｆＳｅｑ　Ａｃｃ．Ｎｏ．ＮＭ―００２４６７、ヒトＮ_ＭＹＣをコードする遺伝子のコード領域は、ＲｅｆＳｅｑ　Ａｃｃ．Ｎｏ．ＮＭ―００５３７８、ヒトＬ―ＭＹＣをコードする遺伝子のコード領域は、ＲｅｆＳｅｑ　Ａｃｃ．Ｎｏ．ＮＭ―００５３７６に示される。本発明の一態様として、本発明に使用される核酸に含まれるヒトｃ_ＭＹＣをコードする遺伝子のコード領域は、ＲｅｆＳｅｑ　Ａｃｃ．Ｎｏ．ＮＭ―００２４６７．３に示される。例えば、ヒトｃ_ＭＹＣをコードする遺伝子のコード領域は、配列番号１３の塩基番号５０４４～６３６０に示される塩基配列である。

マウスｃ―ＭＹＣをコードする遺伝子のコード領域は、ＲｅｆＳｅｑ　Ａｃｃ．Ｎｏ．ＮＭ―０１０８４９、マウスＮ―ＭＹＣをコードする遺伝子のコード領域は、ＲｅｆＳｅｑ　Ａｃｃ．Ｎｏ．ＮＭ―００８７０９、マウスＬ―ＭＹＣをコードする遺伝子のコード領域は、ＲｅｆＳｅｑ　Ａｃｃ．Ｎｏ．ＮＭ―００８５０６に示される。例えば、マウスｃ_ＭＹＣをコードする遺伝子のコード領域は、配列番号１０の塩基番号５０７７～６３９３に示される塩基配列である。

[0022] 本明細書において「自己切断ペプチド」とは、ペプチド配列自体の中の２つのアミノ酸残基の間に生じる切断活性を伴うペプチド配列を意味する。自己切断ペプチドとしては、例えば２Ａペプチド又は２Ａ様ペプチドが例示される。例えば２Ａペプチド又は２Ａ様ペプチドでは、切断はこれらのペプチド上のグリシン残基とプロリン残基との間で生じる。これは翻訳の間に、グリシン残基とプロリン残基との間の正常なペプチド結合の形成が行われない「リボソームスキップ機構」によって生じ、下流の翻訳には影響することはない。リボソームスキップ機構は当分野において知られており、そして１分

子のメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）によりコードされる複数のタンパク質の発現のために使用される。

[0023] 本発明で使用する自己切断ペプチドは、ウィルスの２Ａペプチド又はそれと同等の機能を有する２Ａ様ペプチドから得ることが可能である。例えば、口蹄疫ウィルス（ＦＭＤＶ）由来の２Ａペプチド（Ｆ２Ａ）、ウマ鼻炎Ａウィルス（ＥＲＡＶ）由来の２Ａペプチド（Ｅ２Ａ）、Ｐｏｒｃｉｎｅ ｔｅｓｃｈｏｖｉｒｕｓ（ＰＴＶ―１）由来の２Ａペプチド（Ｐ２Ａ）及びＴｈｏｓｅａ ａｓｉｇｎａ ｖｉｒｕｓ（ＴａＶ）由来の２Ａペプチド（Ｔ２Ａ）から成る群から選択することができる。例えば、配列番号１に示されるアミノ酸配列を有するＴ２Ａ、配列番号６に示されるアミノ酸配列を有するＰ２Ａを使用することができる。２Ａペプチドは、エキスパート オピニォン オン バイオロジカル セラピー、第５巻、６２７―６３８頁、２００５年に総説されている。

[0024] 本明細書において「ＩＲＥＳ（ｉｎｔｅｒｎａｌ ｒｉｂｏｓｏｍａｌ ｅｎｔｒｙ ｓｉｔｅ：内部リボソーム進入部位）」配列とは、リボソームがシストロン（タンパク質コード領域）の開始コドン、例えばＡＵＧへ直接的に進入することを促進し、それによつて、遺伝子のキャップ非依存的な翻訳を開始させるエレメントをいう［トレンズ イン バイオケミカル サイエンス（Ｔｒｅｎｄｓ Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｓｃｉ）、第１５巻、第１２号、第４７７―８３頁、１９９０年］。ＩＲＥＳ配列により連結された複数のシストロンを有する単一のｍＲＮＡから、複数のポリペプチドが翻訳される。

[0025] 本明細書において「コード領域」とは、ｍＲＮＡ分子の翻訳の結果生じるポリペプチドに見られるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列をいう。

[0026] 本発明において、核酸は単離精製された核酸分子であってもよい。単離精製は、当該技術分野において通常実施される方法を用いて行うことができる。単離精製された核酸分子は、当該核酸分子が天然に随伴する物質、例えば細胞においてそれと共に見出される他の核酸分子、ポリペプチド等を含まな

いか、または実質的に含まない。

[0027] 本明細書において 体細胞」とは、生物を構成する細胞のうち、生殖細胞以外の細胞のことを示す。これら体細胞は、核初期化因子を接触させることにより、リプログラミングが起こり、多能性を獲得する。

[0028] （１）６種の核初期化因子をコー ドする遺伝子を含む核酸

本発明の第１の発明は、ＯＣＴ４、ＫＬＦ４、ＳＯＸ２、ＬＩＮ２８、ＮＡＮＯＧ、ＭＹＣファミリーに属するタンパク質の６種の核初期化因子をコ- ドする遺伝子のコー ド領域を含み、それぞれの遺伝子のコー ド領域の間に自己切断ペプチ ドをコー ドする配列を含む核酸である。前記６種の核初期化因子をコー ドする遺伝子のコー ド領域の順は、多能性幹細胞を誘導し得る限りにおいて限定はないが、例えば核酸の５' 末端から順にＯＣＴ４、ＫＬＦ４、ＳＯＸ２、ＬＩＮ２８、ＮＡＮＯＧ、ＭＹＣファミリーに属するタンパク質遺伝子のそれぞれのコー ド領域が並ぶ核酸が好ましい。

[0029] 本発明の第１の発明の核酸は体細胞内で１つのｍＲＮＡとして転写される。転写されたｍＲＮＡからは自己切断ペプチ ド内において切断された形態のポリペプチ ドが翻訳される。例えば自己切断ペプチ ドが２Ａペプチ ドである場合、本発明の第１の発明の核酸から転写されたｍＲＮＡが翻訳される時に、リボソームは２Ａペプチ ド内において特定の１カ所のペプチ ド結合を連結せず、２Ａペプチ ド配列の５' 末端側にコー ドされるポリペプチ ドと３' 末端側にコー ドされるポリペプチ ドを別のポリペプチ ドとして翻訳する。結果、前記の核酸にコー ドされる核初期化因子は別々のポリペプチ ドとして生じる。

したがって、本発明の第１の発明の核酸がコー ドする複数の核初期化因子は、１種も欠けることなくすべて、ほぼ同じ分子数 (等量）で発現する。

[0030] 本発明の第１の発明の核酸は複数の 「自己切断ペプチ ドをコー ドする塩基配列」を含む。これらは、同じアミノ酸配列の自己切断ペプチ ドをコー ドするものであってもよく、異なるアミノ酸配列の自己切断ペプチ ドをコー ドするものであってもよい。同じアミノ酸配列の自己切断ペプチ ドをコー ドする

ものであっても、塩基配列がそれぞれ異なっていてもよい。更に、本発明の核酸が発現される細胞のコドン使用頻度（codon frequency）に合わせて、塩基配列を改変させてもよい。例えば、配列番号2～5に示される塩基配列を有するT2Aをコードする配列、配列番号7に示される塩基配列を有するP2Aをコードする配列に改変させてもよい。

[0031] 更に、本発明の第1の発明の核酸は、核初期化因子の発現を確認するためのマーカーとなりうる遺伝子（例えば薬剤耐性に関する因子をコードする遺伝子、レポーター酵素をコードする遺伝子、又は蛍光タンパク質をコードする遺伝子等）のコード領域を含みうる。

[0032] 本発明の第1の発明の核酸は、適当なプロモーターの制御下に発現されるように別の核酸と連結して使用することができる。プロモーターとしては構成的に発現を促進するもの、薬剤等（例えば、テトラサイクリン又はドキソルビシン）により誘導されるもの等のいずれも用いることができる。また、効率のよい転写を達成するために、プロモーター又は転写開始部位と協同する他の調節要素、例えば、エンハンサー配列又はターミネーター配列を含む核酸を連結してもよい。また、更に本発明の第1の発明の核酸に加えて、当該核酸の発現を確認するためのマーカーとなりうる遺伝子（例えば薬剤耐性遺伝子、レポーター酵素をコードする遺伝子、又は蛍光タンパク質をコードする遺伝子等）を組み込んでもよい。

[0033] 本発明の第1の発明の核酸は、体細胞へ導入するためにベクターに挿入して使用することができる。本発明の核酸が挿入されるベクターには特に限定はなく、公知のベクターより適切なものを選択して使用することができる。例えば、ウィルスベクターを使用する方法、又は非ウィルスベクターを使用する方法のいずれもが本発明に使用できる。これらのベクターの詳細についてはすでに多くの文献が公表されており、これら多くの文献より適宜選択して使用すればよい。本発明の第1の発明の核酸が挿入されたベクターも本発明に包含される。

[0034] 上記のウィルスベクターには特に限定はなく、通常、遺伝子導入方法に使

用される公知のウィルスベクター、例えば、レトロウイルスベクター (オンコレトロウイルスベクター、レンチウィルスベクター、シユードタイプベクターを包含する)、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウィルスベクター、シミアンウィルスベクター、ワクシニアウィルスベクター又はセンダイウィルスベクター等が使用できる。特に好適には、オンコレトロウイルスベクター、レンチウィルスベクター又はアデノウィルスベクターが使用できる。上記ウィルスベクターとしては、感染した細胞中で自己複製できないように複製能を欠損させたものが好適である。

また、上記の非ウィルスベクターには特に限定はなく、通常、遺伝子導入方法に使用される公知の非ウィルスベクター、例えば、プラスミドベクターが使用できる。

[0035] (2) 核初期化因子をコードする遺伝子を含む核酸のセット

本発明の第2の発明は、以下の核酸のセットを提供する。

(a) ＯＣＴ４、ＫＬＦ４、ＳＯＸ２、ＬＩＮ２８、ＮＡＮＯＧ及びＭＹＣファミリーに属するタンパク質からなる群より選択される少なくとも3種の核初期化因子をコードする遺伝子のコード領域を1つの分子内に含む核酸、及び

(b) ＯＣＴ４をコードする遺伝子のコード領域を含む他の核酸。

[0036] 前記 (a) の核酸がコードする核初期化因子は、ＯＣＴ４、ＫＬＦ４、ＳＯＸ２、ＬＩＮ２８、ＮＡＮＯＧ及びＭＹＣファミリーに属するタンパク質からなる群より選択される少なくとも3種類の核初期化因子である。前記 (a) の核酸は、例えば3種類、4種類、5種類又は6種類の核初期化因子をコードする遺伝子のコード領域を含む核酸である。前記 (a) の核酸は、多能性幹細胞を誘導し得る限りにおいて限定はないが、例えば少なくともＯＣＴ４及びＫＬＦ４をコードする遺伝子のコード領域を含む核酸、少なくともＯＣＴ４、ＫＬＦ４、ＳＯＸ２及びＭＹＣファミリーに属するタンパク質をコードする遺伝子のコード領域を含む核酸、少なくともＯＣＴ４、ＫＬＦ４、ＳＯＸ２、ＬＩＮ２８及びＮＡＮＯＧをコードする遺伝子のコード領域を

含む核酸が使用され得る。各核初期化因子の順は、多能性幹細胞を誘導し得る限りにおいて限定はないが、 (a) の核酸の5' 末端から順にＯＣＴ４及びＫＬＦ４をコー ドする遺伝子のコー ド領域が配置されることが好ましく、例えば、5' 末端から順にＯＣＴ４、ＫＬＦ４、ＳＯＸ２及びＭＹＣファミリーに属するタンパク質をコー ドする遺伝子のコー ド領域の順又はＯＣＴ４、ＫＬＦ４、ＳＯＸ２、ＬＩＮ２８、ＮＡＮＯＧをコー ドする遺伝子のコー ド領域の順に並ぶ核酸が好ましい。

[0037] 本発明の第２の発明の１つの態様において、前記 (a) の核酸は、当該核酸に含まれる核初期化因子をコー ドする遺伝子のコー ド領域を、自己切断ペプチ ドをコー ドする配列及びＩＲＥＳ配列から選択される配列を介して相互に接続させて、ポリシス トロニックな核酸とすることができる。核初期化因子のコー ド領域を接続する配列は、自己切断ペプチ ドをコー ドする配列のみ、ＩＲＥＳ配列のみ、又はこれらの両方の配列を使用することができる。例えば、本発明の第１の発明の核酸を用いることもできる。

[0038] 本発明の第２の発明の１つの態様において、前記 (a) の核酸は自己切断ペプチ ドをコー ドする配列を含む１つのｍＲＮＡとして転写され、転写されたｍＲＮＡからは自己切断ペプチ ド内において切断された形態のポリペプチ ドが翻訳される。例えば自己切断ペプチ ドが２Ａペプチ ドである場合、核酸から転写されたｍＲＮＡが翻訳される時に、リボソームは２Ａペプチ ド内において特定の１カ所のペプチ ド結合を連結せず、２Ａペプチ ド配列の5' 末端側にコー ドされるポリペプチ ドと3' 末端側にコー ドされるポリペプチ ドを別のポリペプチ ドとして翻訳する。結果、本発明に使用される核酸にコー ドされる核初期化因子は別々のポリペプチ ドとして生じる。

したがって、自己切断ペプチ ドにより連結された複数の核初期化因子は、１種も欠けることなくすべて、ほぼ同じ分子数 (等量) で発現する。

[0039] 前記 (a) の核酸は複数の 「自己切断ペプチ ドをコー ドする塩基配列」を含んでいてもよい。これらは、同じアミノ酸配列の自己切断ペプチ ドをコー ドするものであってもよく、異なるアミノ酸配列の自己切断ペプチ ドをコー

ドするものであってもよい。同じアミノ酸配列の自己切断ペプチドをコードするものであっても、塩基配列がそれぞれ異なっていてもよい。更に、前記核酸が発現される細胞のコドン使用頻度（codon frequency）に合わせて、塩基配列を改変させてもよい。例えば、配列番号２～５に示される塩基配列を有する２Ａペプチドをコードする配列を使用することができる。

[0040] 本発明の第２の発明の１つの態様において、前記（ａ）の核酸はＩＲＥＳ配列を含む１つのｍＲＮＡとして転写され、転写されたｍＲＮＡに含まれるシストロンの開始コドンへ、リボソームが直接的に進入し、シストロンが切断された形態のポリペプチドが翻訳される。本発明は、任意のＩＲＥＳ配列が使用可能である。例えば、ピコルナウィルス由来［トレンズ バイオケミカル サイエンス（Ｔｒｅｎｄｓ Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｓｃｉ）、第１５巻、第１２号、第４７７―８３頁、１９９０年］、ＥＭＣＶ（脳心筋炎ウィルス）由来、ＦＭＤＶ（口蹄疫ウィルス）由来、ＨＣＶ（Ｃ型肝炎ウィルス）由来等のウィルス由来のＩＲＥＳが使用可能である。また、免疫グロブリン重鎖結合タンパク質（ＢｉＰ）由来、血管内皮成長因子（ＶＥＧＦ）由来［モレキュラー セル バイオロジー（Ｍｏｌ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ）、第１８巻、第１１号、第６１７８―６１９０頁、１９９８年］、線維芽細胞成長因子２由来、インスリン様成長因子由来、翻訳開始因子ｅＩＦ４Ｇ由来、酵母転写因子ＴＦＩＩＤ及びＨＡＰ４由来の哺乳動物細胞を含む細胞由来のｍＲＮＡのＩＲＥＳ配列が使用可能である。

[0041] 本発明の第２の発明の１つの態様において、前記（ａ）の核酸は核初期化因子をコードする遺伝子のコード領域を接続する配列として、自己切断ペプチドをコードする配列及びＩＲＥＳ配列の両方の配列を含む。特に限定はないが、例えばＩＲＥＳ配列を１カ所に使用する場合は、核酸の５'末端から数えて第１の核初期化因子をコードする遺伝子のコード領域と第２の核初期化因子をコードする遺伝子のコード領域の間に配置することが好ましい。

[0042] 本発明の第２の発明の核酸のセットに含まれる、前記（ｂ）ＯＣＴ４をコ

- ドする遺伝子のコー ド領域を含む他の核酸は、１つのｍＲＮＡとして転写され、転写されたｍＲＮＡからはＯＣＴ４が翻訳される。 (b) の核酸は (a) の核酸とは連結していない別の分子である他の核酸であり、互いに独立してｍＲＮＡを転写する。

[0043] 本発明の第２の発明の核酸のセットに使用される (a) の核酸及び (b) の核酸は、適当なプロモーターの制御下に発現されるように別の核酸と連結して使用することができる。プロモーターとしては構成的に発現を促進するもの、薬剤等 (例えば、テトラサイクリン又はドキソルビシン) により誘導されるもの等のいずれも用いることができる。また、効率のよい転写を達成するために、プロモーター又は転写開始部位と協同する他の調節要素、例えば、エンハンサー配列又はターミネーター配列を含む核酸を連結してもよい。また、更に本発明の核酸のセットに加えて、当該核酸の発現を確認するためのマーカーとなりうる遺伝子 (例えば薬剤耐性遺伝子、レポーター酵素をコー ドする遺伝子、又は蛍光タンパク質をコー ドする遺伝子等) を組み込んでもよい。

[0044] 本発明は、前記 (a) の核酸及び (b) の核酸を、体細胞へ導入するためにそれぞれ別のベクターに挿入したベクターのセットを含む。本発明に使用されるベクターには特に限定はなく、公知のベクターより適切なものを選択して使用することができる。例えば、ウィルスベクターを使用する方法、又は非ウィルスベクターを使用する方法のいずれもが本発明に使用できる。ウィルスベクターを使用する場合は、本発明の核酸のセットを構成する (a) の核酸及び (b) の核酸は、別々のウィルス粒子に含まれる。これらのベクターの詳細についてはすでに多くの文献が公表されており、これら多くの文献より適宜選択して使用すればよい。 (a) の核酸が挿入されたベクター及び (b) の核酸が挿入されたベクターのセットも本発明に包含される。

[0045] 上記のウィルスベクターには特に限定はなく、通常、遺伝子導入方法に使用される公知のウィルスベクター、例えば、レトロウイルスベクター (オンコレトロウイルスベクター、レンチウィルスベクター、シユー ドタイプベク

ターを包含する）、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウィルスベクター、シミアンウィルスベクター、ワクシニアウィルスベクター又はセンダイウィルスベクター等が使用できる。特に好適には、オンコレトロウイルスベクター、レンチウィルスベクター又はアデノウィルスベクターが使用できる。上記ウィルスベクターとしては、感染した細胞中で自己複製できないように複製能を欠損させたものが好適である。

また、上記の非ウィルスベクターには特に限定はなく、通常、遺伝子導入方法に使用される公知の非ウィルスベクター、例えば、プラスミドベクターが使用できる。

[0046] （3）本発明の多能性幹細胞の製造方法

本発明の多能性幹細胞の製造方法は、体細胞に前記 (1) に記載する本発明の第1の発明の核酸又は当該核酸を挿入されたベクター、又は前記 (2) に記載する本発明の第2の発明の核酸のセット又は当該セットの核酸がそれぞれ挿入されたベクターのセットを導入する工程を包含することを特徴とする。当該工程は体外で実施される。当該方法は、従来の方法に比べて、多能性幹細胞を高効率で製造することができ、例えば、導入された細胞の約0.1～1.2％が多能性幹細胞に誘導される。

[0047] 本発明の方法は、哺乳動物、例えばヒト又はマウス、ラット、ブタ、ウシ、イヌ等の非ヒト哺乳動物由来の体細胞が使用できる。

[0048] 本発明の方法に使用される体細胞に特に限定はなく、任意の体細胞を使用することができる。例えば、線維芽細胞、前駆脂肪細胞、肝細胞、血球細胞、皮膚角化細胞、間葉系幹細胞、造血幹細胞、脂肪幹細胞、各種癌細胞株、歯周靭帯線維芽細胞又は神経幹細胞等の体細胞を使用することができる。前記の体細胞は生体より採取されたもの、又は細胞株として樹立されたもののどちらでもよい。作製された多能性幹細胞もしくは当該細胞より分化させた細胞を生体に移植することが望まれる場合には、その生体自身から採取された体細胞より多能性幹細胞を誘導することが好ましい。

[0049] 本発明の方法において、体細胞へ核酸又はベクターを導入する工程は、使

用する体細胞、ベクターに応じて適宜操作することができる。非ウィルスベクターを使用する場合、リボソーム、カチオニックリピッドもしくはリガンドーポリリジンなどの担体を使用して導入する方法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーションヨン法、又はパーティクルガン法などで導入することができる。また、ウィルスベクターを使用する場合、核酸又はベクター導入の際に、導入効率を向上させる物質を用いることもできる。導入効率を向上させる物質としては、ウィルスベクターに結合する活性を有する物質、例えばフイブロネクチン又はフイブロネクチンフラグメントなどの物質が挙げられる。好適には、ヘパリン結合部位を有するフイブロネクチンフラグメント、例えばレトロネクチン (登録商標、ＣＨ＿２９６、タカラバイオ社製）として市販されているフラグメントを用いることができる。更に、本発明を特に限定するものではないが、前記の物質は特にレトロウィルスベクター又はレンチウィルスベクターを使用する遺伝子導入に好適である。さらに、穿孔法（エレクトロポレーションヨン法、パーティクルガン法等）による細胞への核酸の導入において、フイブロネクチンゃフイブロネクチンフラグメントの使用が導入効率を向上させることが知られている (国際公開第９６／１７０７３号パンフレット)。

[0050] 従来、多能性幹細胞の誘導を目的としたレトロウイルスベクターによる遺伝子導入では、レトロウイルスの細胞への感染効率を向上させる作用を有する合成ポリカチオンであるポリプレンが使用されてきた。本発明者らは、ポリブレンを使用せず、レトロウイルスに結合する活性を有する機能性物質の存在下に、レトロウイルスベクターを使用して本発明の第１の発明の核酸又は本発明の本発明の第２の発明の核酸のセットを体細胞に導入した場合には、ポリプレンを使用した場合に比較して多能性幹細胞の誘導効率が向上する結果、高頻度で多能性幹細胞を取得できることを見出した。すなわち、本発明の１つの態様として、レトロウイルスに結合する活性を有する機能性物質の存在下に体細胞に導入する工程を包含することを特徴とする、多能性幹細胞の製造方法が提供される。

[0051] また、レトロウイルスに結合する活性を有する機能性物質としては、当該活性を有する物質であれば特に問題はないが、例えば、フイブロネクチン、線維芽細胞増殖因子、V型コラーゲン、前記のポリペプチドのフラグメント、ポリリジン又はＤＥＡＥ―デキストラン等がある。更に、前記物質由来のレトロウィルスに結合部位を有する機能性物質を本発明に使用することができる。フイブロネクチンフラグメントとしては分子内にヘパリンーＩＩ結合領域を有するものが好適であり、そのようなフラグメントは例えば国際公開第９７／１８３１８号パンフレツトにも記載されている。ヘパリンーＩＩ結合領域を有する組換えフイブロネクチンフラグメントとしては前出のレトロネクチンが例示される。またこれらの機能性物質と機能的に同等な物質、例えば、ヘパリン結合性部位を有する機能性物質も使用することができる。また、該機能性物質の混合物、該機能性物質を含有するポリペプチド、該機能性物質の重合体、又は該機能性物質の誘導体等を使用することができる。

[0052] 更に、レトロウイルスに結合する活性とともに標的細胞、すなわち核酸又はベクターを導入しょうとする体細胞への結合活性を有する機能性物質を併用してもよく、レトロウィルスに結合する活性を有する機能性物質及び標的細胞結合活性を有する機能性物質を併用してもよい。標的細胞結合活性を有する機能性物質にも、特に限定はないが、例えば、標的細胞に結合するリガンドを有する物質が挙げられる。該リガンドとしては細胞接着性のタンパク質 (フイブロネクチン、ラミニン、コラーゲン等) もしくはそのフラグメント、ホルモン、サイトカイン、細胞表面の抗原に対する抗体、多糖類、糖タンパク質、糖脂質、糖タンパク質もしくは糖脂質由来の糖鎖、あるいは標的細胞の代謝物などが挙げられる。

[0053] 本発明の多能性幹細胞の製造方法において、本発明の第2の発明の核酸のセット又は当該セットの核酸がそれぞれ挿入されたベクターのセットに含まれる (a) の核酸及び (b) の核酸の量や比率は、導入する細胞、使用するベクター、多能性幹細胞の製造効率等に応じて適宜設定することができる。例えば、体細胞に導入される (a) の核酸及び (b) の核酸を、分子数が等

量となるように、重量が等量となるように、又はウィルスベクターを使用する場合はウィルスタイターが同等となるように使用することができる。

[0054] 本発明の好適な態様において、前記の機能性物質は適切な固相、例えば細胞培養に使用される容器 (プレート、シャーレ、フラスコもしくはバッグ等) 又は担体 (マイクロビーズ等) に固定化された状態で使用される。

[0055] 前記の核酸、ベクター、又はそれらのセットを体細胞に導入する場合には、フィーダー細胞上に培養された体細胞に対して導入を行ってもよいが、フィーダー細胞を使用することなく体細胞に導入を行ってもよい。フィーダー細胞としては、ＥＳ細胞の培養に用いられるフィーダー細胞を適宜使用することができるが、例えばマウス１４～１５日胚の繊維芽細胞初代培養細胞や繊維芽細胞由来細胞株であるＳＴＯ細胞等をマイトマイシンＣ等の薬剤や放射線により処理した細胞などを使用することができる。本発明の核酸などが導入された体細胞の培養はフィーダー細胞上で行うことが好ましいが、フィーダー細胞を使用しないＥＳ細胞の培養方法も報告されている。

[0056] 本発明の第１の発明の核酸又は当該核酸が挿入されたベクター、又は本発明の第２の発明の核酸のセット又は当該セットの核酸がそれぞれ挿入されたベクターのセットを導入した体細胞を適切な条件下で培養することにより、自律的に核のリプログラミングが進行し、体細胞から多能性幹細胞を製造することができる。当該培養には、ＥＳ細胞やｉＰＳ細胞に使用可能な公知の培地を使用することができる。本発明の核酸などを体細胞に導入した後、体細胞が多能性を獲得して増殖するのに十分な時間にわたり細胞を培養することが好ましい。導入後の体細胞の培養密度は、例えば細胞培養用ディッシュあたり1×10^4～1×10^5ｃｅｌｌｓ／ｍＬの細胞密度で培養を継続することが好ましい。

[0057] 核酸又はベクターが導入された細胞は、導入する工程を実施してからＥＳ細胞用の培地に交換するまで、通常の体細胞を培養するための培地を使用して、例えば１～１２日間、好ましくは２～１０日間培養する。その後ＥＳ細胞用培地に交換して、例えば５～４０日間、好ましくは１０～３５日間培養

する。

[0058] 上記の操作で得られた体細胞が多能性を獲得したことは、例えば未分化細胞に特有のマーカー、例えばＲｅｘ１、Ｏｃｔ４、Ｆｂｘ１５、ＮＡＮＯＧ、アルカリホスファターゼ（ＡＬＰ）、ＳＳＥＡ＿３、ＳＳＥＡ＿４、ＡＢＣＧ―２及びＥ＿ｃａｄｈｅｒｉｎなどを検出することにより容易に判定することができる。マーカーの種類や判定手段については公知文献により具体的かつ詳細に説明されている（例えば、セル、第１２６巻、６６３―６７６頁、２００６年、セル、第１３１巻、８６１―８７２頁、２００７年）。ＥＳ細胞特異的発現遺伝子のプロモーター下流にＧＦＰ等のマーカー遺伝子を組み込んだＤＮＡを有する体細胞を使用した場合は、当該マーカー遺伝子の発現を指標として多能性幹細胞を特定することが可能である。また、一般的に多能性の獲得はコロニー形成により判定することもできる。コロニーは通常５００～１０００ｃｅｌｌｓの細胞集団であり、特徴的な外観を呈することが知られているので、多能性幹細胞が増殖して形成したコロニーを容易に特定することができる。

（４）本発明の細胞

上記の、本発明の多能性幹細胞の製造方法により、本発明の第１の発明の核酸又は本発明の第２の発明の核酸のセットを含む細胞を調製し、その中から多能性を獲得した細胞を選択することができる。こうして得られた多能性幹細胞のコロニーを単離してクローニングを実施することにより、多能性を有しない細胞が除去された、多能性幹細胞の細胞株を樹立することができる。更に、こうして得られた多能性幹細胞について、公知の分化操作を適用して所望の分化を誘導することにより、神経細胞、心筋細胞、肝細胞、膵細胞、脂肪細胞、表皮細胞、軟骨、腸管様内胚葉組織といった任意の細胞、組織を製造することができる。

実施例

[0059] 以下に実施例をもって本発明を更に具体的に示すが、本発明は以下の実施例の範囲のみに何ら限定されるものではない。

[0060] 調製例１　２Ａペプチド連結型ｉＰＳ細胞誘導プラスミドｐＤＯＮ５＿ｈＯＫＳ、ｐＤＯＮ５＿ｈＯＫＳＬ、ｐＤＯＮ５-ｈＯＫＳＮ、ｐＤＯＮ５-ｈＯＫＳＬＮ（Ｐ２Ａ）、ｐＤＯＮ５-ｈＯＫＳＬＮ（Ｔ２Ａ）プラスミドの構築

ＲｅｆＳｅｑ　Ａｃｃ．Ｎｏ．ＮＭ_０　０４２３５．３（ｈＫＬＦ４遺伝子）、ＮＭ―００３１０６．２（ｈＳＯＸ２遺伝子）、ＮＭ―００２４６７．３（ｈｃ＿ＭＹＣ遺伝子）の配列情報より、遺伝子増幅用合成プライマーをそれぞれ合成した。ＨｕｍａｎＢｒａｉｎＰｏｌｙＡ＋ＲＮＡ（クロンテック社製）より合成したｃＤＮＡを鋳型とし、各核初期化因子をコードする遺伝子のコード領域に対応するプライマー対を用いてＰｒｉｍｅＳＴＡＲ（登録商標）ＭＡＸ　ＰｒｅＭｉｘ又はＨＳ　ＤＮＡ　ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ（いずれもタカラバイオ社製）によりＰＣＲを行った。反応終了後、反応液を１．０％アガロースゲル電気泳動に供し、ｈＫＬＦ４遺伝子を含む約１．５ｋｂｐのＤＮＡフラグメント、ｈＳＯＸ２遺伝子を含む約１ｋｂｐのＤＮＡフラグメント、ｈｃ＿ＭＹＣ遺伝子を含む約１．３ｋｂｐのＤＮＡフラグメントをそれぞれ抽出、精製した。また、ＲｅｆＳｅｑ　Ａｃｃ．Ｎｏ．ＮＭ―００２７０１．４（ｈＯＣＴ４遺伝子）、ＮＭ―０２４６７４．４（ｈＬＩＮ２８遺伝子）、ＮＭ_０　２４８６５．２（ｈＮＡＮＯＧ遺伝子）の配列情報により、ｈＯＣＴ４遺伝子を含む約１．１ｋｂｐのＤＮＡフラグメント、ｈＬＩＮ２８遺伝子を含む約０．７ｋｂｐのＤＮＡフラグメント、ｈＮＡＮＯＧ遺伝子を含む約１ｋｂｐのＤＮＡフラグメントを化学的に合成した。

[0061] Ｔｈｏｓｅａ　ａｓｉｇｎａ　ｖｉｒｕｓ及びＰｏｒｃｉｎｅ　ｔｅｓｃｈｏｖｉｒｕｓ＿１由来の２Ａペプチド配列、Ｔ２Ａ及びＰ２Ａを公知文献（ネィチヤー　ﾊﾞｲｵテクノロジー（Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）、第２２巻、第５号、５８９―９４頁、２００４年）より得た。Ｔ２Ａのアミノ酸配列を配列番号１に示す。Ｔ２Ａのアミノ酸配列に対して、ヒトのコドンに最適化した４種類の異なる塩基配列を設計し、それぞれＴ２

Ａ１、Ｔ２Ａ２、Ｔ２Ａ３、Ｔ２Ａ４と命名した。それぞれの塩基配列を配列番号２、３、４、５に示す。また、Ｐ２Ａのアミノ酸配列を配列番号６に、塩基配列を配列番号７に示す。Ｔ２Ａ１、Ｔ２Ａ２、Ｔ２Ａ３、Ｔ２Ａ４、Ｐ２Ａの塩基配列を有するＤＮＡフラグメントをそれぞれ合成した。

[0062] 前記の核初期化因子のコード領域由来のＤＮＡフラグメント及び２Ａペプチドをコードするフラグメントを用いて、ベクターへのサブクローニング、ＰＣＲ、制限酵素消化、ライゲーション反応を繰り返し、核初期化因子のコード領域及び２Ａペプチドをコードするフラグメントを５'末端から表１に記載される順に含むＤＮＡフラグメントを調製し、レトロウイルスベクターｐＤＯＮ―５　ＤＮＡ（タカラバイオ社製）に挿入し、それぞれｐＤＯＮ５＿ｈＯＫＳ、ｐＤＯＮ５＿ｈＯＫＳＬ、ｐＤＯＮ５-ｈＯＫＳＬＮ（Ｐ２Ａ）と命名した。更に、ｐＤＯＮ５＿ｈＯＫＳＬＮ（Ｐ２Ａ）のＰ２Ａフラグメントをフラグメントに置換したｐＤＯＮ５―ｈＯＫＳＬＮ（Ｔ２Ａ）を調製した。

[0063] [表1]

ベクター名	5'末端から連結されるＤＮＡフラグメント
pDON5-hOKS	hOCT4、T2A1、hKLF4、T2A2、hSOX2
pDON5-hOKSL	hOCT4、T2A1、hKLF4、T2A2、hSOX2、T2A3、hLIN28
pDON5-hOKSLN(P2A)	hOCT4、T2A1、hKLF4、T2A2、hSOX2、T2A3、hLIN28、P2A、hNANOG
pDON5-hOKSLN(T2A)	hOCT4、T2A1、hKLF4、T2A2、hSOX2、T2A3、hLIN28、T2A4、hNANOG

[0064] 調製例２　ｉＰＳ細胞誘導プラスミドｐＤＯＮ５＿ｈｃ＿ＭＹＣプラスミド及び２Ａペプチド連結型ｉＰＳ細胞誘導プラスミドｐＤＯＮ５＿ｈＯＫＳＭ、ｐＤＯＮ５-ｈＯＫＳＬＭ、ｐＤＯＮ５―ｈＯＫＳＬＮＭプラスミドの構築

ＲｅｆＳｅｑ　Ａｃｃ．Ｎｏ．ＮＭ―００２４６７．３（ｃ＿ＭＹＣ遺伝子）の配列情報より、遺伝子増幅用合成プライマーをそれぞれ合成した。ＨｕｍａｎＢｒａｉｎＰｏｌｙＡ＋ＲＮＡ（クロンテック社製）より合成したｃＤＮＡを鋳型とし、ｃ―ＭＹＣ遺伝子に対応するプライマー対を用いてＰｒｉｍｅＳＴＡＲ（登録商標）ＨＳ　ＤＮＡ　Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ（タカ

ラバイオ社製）によりＰＣＲを行った。反応終了後、反応液を１．０％アガロースゲル電気泳動に供し、約１．３ｋｂのｃ―ＭＹＣ遺伝子フラグメントを得た。これを制限酵素により切断し、同じく制限酵素により切断したｐＤＯＮ―５に挿入し、得られたプラスミドベクターをｐＤＯＮ５- ｈｃ- ＭＹＣとした。

[0065] Ｉｎ―Ｆｕｓｉｏｎ Ａｄｖａｎｔａｇｅ ＰＣＲクローニングキット（クロンテック社製）を用いてディレクショナルクローニングにより、調製例１で構築したｐＤＯＮ５＿ｈＯＫＳ、ｐＤＯＮ５- ｈＯＫＳＬ、ｐＤＯＮ５―ｈＯＫＳＬＮ（Ｐ２Ａ）に、更にＴ２Ａ４フラグメントとｃ―ＭＹＣ遺伝子が連結したｐＤＯＮ５＿ｈＯＫＳＭ、ｐＤＯＮ５- ｈＯＫＳＬＭ、ｐＤＯＮ５- ｈＯＫＳＬＮＭを構築した。各挿入ＤＮＡフラグメントの構造を表２に示す。構築に使用したプライマーはキットの取扱説明書に従って設計し、鋳型には調製例１のプラスミド及び前記ｐＤＯＮ５＿ｈｃ＿ＭＹＣを用いた。

[0066] [表2]

ベクター名	5'末端から連結されるＤＮＡフラグメント
pDON5-hOKSM	hOCT4、T2A1、hKLF4、T2A2、hSOX2、T2A4、hc-MYC
pDON5-hOKSLM	hOCT4、T2A1、hKLF4、T2A2、hSOX2、T2A3、hLIN28、T2A4、hc-MYC
pDON5-hOKSLNM	hOCT4、T2A1、hKLF4、T2A2、hSOX2、T2A3、hLIN28、P2A、hNANOG、T2A4、hc-MYC

[0067] 各挿入ＤＮＡフラグメントの構造を図４に示す。ｐＤＯＮ５＿ｈＯＫＳＬＮＭの挿入フラグメントの塩基配列を配列番号８に示す。

[0068] 調製例３ レトロウイルスベクターの調製

（１）レトロウイルスベクターの産生

Ｇ３Ｔｈｉ細胞 (タカラバイオ社製）を５ｘ１０^{5}ｃｅｌｌｓ／ｍＬとなるように１０Ｆ―ＤＭＥＭ［１０％牛胎児血清 (インビトロジェン社製）及び５０Ｕ／ｍＬペニシリン／５０ｍｇ／ｍＬストレプトマイシン (ナカライ社製）含有Ｄ―ＭＥＭ（シグマ社製）］に懸濁し、その４巾$_{1}$を６ｃ巾コラーゲンコートディッシュ (イワキ社製）に播種して３７℃のＣ０$_{2}$インキュベー

ターで２４時間培養した。

[0069] ５００〃１のＯＰＴＩ—ＭＥＭ（インビトロジェン社製）に１０〃ＬのＴｒａｎｓＩＴ（登録商標）_２９３（タカラバイオ社製）を混合し、室温で５分放置後、２〃ｇのｐＧＰプラスミド（タカラバイオ社製）、１〃ｇのＲＥ_Ａｍｐｈｏプラスミド（タカラバイオ社製）及び２μｇの調製例１及び２で調製した各組換えプラスミドをそれぞれ加えて混合し、更に１５分間室温で放置した。この混合液を上記のＧ３Ｔｈｉ細胞に添加して培養を継続し、２４時間後に４ｍＬの１０Ｆ—ＤＭＥＭ培地に交換した。更に２４時間培養を継続した後、ウィルスを含む培地を回収し、０．４５μｍのフィルターでろ過してレトロウイルスベクターを含むウィルス液を調製した。ウィルス液は－８０℃で凍結保存し、使用時に３７℃恒温水槽にて溶解した。

[0070] （２）ウィルス液の混合及び希釈

レトロウィルスは特に記載のない限り１０Ｆ—ＤＭＥＭにて３０倍希釈して使用した。なおコントロールとして、ＯＣＴ４及びＳＯＸ２をＥｎｃｅｐｈａｌｏｍｙｏｃａｒｄｉｔｉｓ ｖｉｒｕｓ由来のＩＲＥＳ（ｉｎｔｅｒｎａｌ Ｒｉｂｏｓｏｍｅ Ｅｎｔｒｙ Ｓｉｔｅ）を介してポリシストロニックに翻訳させるためのレトロウィルスベクターｐＤＯＮ-５ ＯＣＴ３／４_ＳＯＸ２、ＬＩＮ２８及びＮＡＮＯＧをＩＲＥＳを介してポリシストロニックに翻訳させるためのレトロウィルスベクターｐＤＯＮ-５ ＬＩＮ２８_ＮＡＮＯＧ、及びＫＬＦ４を発現するレトロウィルスベクターｐＤＯＮ—５ ＫＬＦ４九らなるＨｕｍａｎ ｉＰＳ Ｃｅｌｌ Ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ（登録商標） Ｖｅｃｔｏｒ Ｓｅｔ（タカラバイオ社製）を用いた。コントロールは各ウィルスを混合した後１０倍希釈して実験に供した。表３にベクター名と各ウィルス液の名称を示す。

[0071]

ほ 3]

ベクター名	ウイルス液
ｐＤＯＮ５－ｈＯＫＳＬＮ（Ｔ２Ａ）	Ａ
ｐＤＯＮ５－ｈＯＫＳＬＮＭ	Ｂ
ｐＤＯＮ－５　ＯＣＴ３／４－ＳＯＸ２ ｐＤＯＮ－５　ＬＩＮ２８－ＮＡＮＯＧ ｐＤＯＮ－５　ＫＬＦ４	Ｃ

[0072] 実施例１　ｉＰＳ細胞の誘導

（１）レトロネクチンの培養プレートへの固定化

ノントリートメント１２穴培養プレート (ベクトン・ディッキンソン社製) の各ゥエルに２０パｇ／ｍＬとなるように、リン酸緩衝水溶液 (ＰＢＳ) で希釈したレトロネクチン (タカラバイオ社製) 溶液を１ｍＬずつ添加し、４℃で一晩固定化を行った。その後、各ゥエルより溶液を除去し、ＰＢＳで１回洗浄の後、各実験に供するまで４℃で保存した。

（２）レトロウイルスベクターによる遺伝子導入１回目

実施例１_（１）で調製したレトロネクチン固定化培養プレートの各ゥエルに、表３に示すウィルス液Ａ、Ｂ及びＣを１ｍＬずつ添加し、３２℃、２、０００ｘｇで２時間遠心した。その後、各ゥエルより上清を除去して、１．５％ブミネート (献血アルブミン、バクスター社製) を含むＰＢＳで１回洗浄後、４ｘ１０^{4}ｃｅｌｌｓ／ｍＬとなるように１０Ｆ—ＤＭＥＭで懸濁したヒト成人皮膚繊維芽細胞 (Ｌｏｎｚａ社製) を１ｍＬずつ各ゥエルに播種し、３７℃のＣＯ$_{2}$インキュベーターで培養を開始した (培養０日目)。

[0073] このとき、２回目の遺伝子導入のためのウィルスコートプレートも同時に調製し、細胞懸濁液の代わりに１．５％ブミネートを含むＰＢＳを添加し4℃で保存した。ポリプレンによる遺伝子導入に関しては、以下の方法で行った。すなわち、培養１日前に１２穴培養プレートに、４ｘ１０^{4}ｃｅｌｌｓ／ｍＬとなるように１０Ｆ_ＤＭＥＭで懸濁したヒト皮膚繊維芽細胞を１ｍＬずつ各ゥエルに播種し１日培養した。その後、細胞培養プレートより上清を除去し、ウィルス液Ａ、Ｂ、Ｃに終濃度８パｇ／ｍＬとなるようにポリブレ

ン (ヘキサジメトリン・ブロミド ;アル ドリツチ社製) を加えた調製液を各ゥエル 1 m L 添加、培養を開始した (培養 0 日目)。

[0074] (3) レトロウイルスベクターによる遺伝子導入 2 回目

2 回目の遺伝子導入は培養 1 日目に行った。レトロネクチンによる遺伝子導入に関しては、前日遺伝子導入を行った細胞を剥離し 10F—DMEM に懸濁した後、実施例 1_ (1) で調製したウィルスコートプレートの各ゥエルに播種した。ポリプレンによる感染については、前日遺伝子導入を行った細胞上清を除去し、実施例 1_ (2) と同様にポリプレンを混合して調製したウィルス液を添加し培養を継続した。いずれの感染法においても、翌日上清を除去し 10F—DMEM 培地を 1mL 添加して培養を継続した。

[0075] (4) フィーダー細胞上への播種

6 穴培養プレート (コーニング社製) に終濃度 1mg/mL のゼラチン (シグマ社製) 水溶液を各ゥエル 1mL 添加し、37°C、30 分で固定化した。ここに終濃度 12〃g/mL のマイトマイシン C (ナカライテスク社製) で処理した SNL76/7 細胞 (DS ファーマ社製) を、各ゥエル 2.5X10^5cells ずつ播種し、37°C の CO_2 インキュベーターで終夜培養することによりフィーダー細胞を調製した。実施例 1_ (3) で作製した培養 6 日目の遺伝子導入細胞を回収し 10F—DMEM 培地に懸濁した。各ゥエル 20000Cells を前記のフィーダー細胞上に播種し、終夜培養した。翌日、培養 7 日目に上清を除去し、ES 細胞用培地 [80% D-MEM/F-12 (インビトロジェン社製)、20% KnockOut Serum Replacement (インビトロジェン社製)、4ng/mL human basic FGF (CALBIOCHEM 社製)、1x Non—essential amino acids solution (Lonza 社製)、2mM L—Gluthamine (Lonza 社製)、110μM 2_ メルカプトエタノール (インビトロジェン社製)、50U/mL ペニシリン/50mg/mL ストレプトマイシン] を各ゥエル 2mL 添加し、培養 28 日目まで培養を継続した。この間、2 日おきに培地を交換

した。

[0076] （５）ｉＰＳ細胞コロニーの計測

培養２６日目にＴＲＡＣＰ＆ＡＬＰ ｄｏｕｂｌｅ- ｓｔａｉｎ Ｋｉｔ（タカラバイオ社製）によってアルカリホスファターゼ (ＡＰ）活性をもつ細胞を染色した。ＡＰ活性を示しヒトＥＳ細胞様の形態を示すｉＰＳ細胞コロニー数を計測した。その結果を表４に示す。

[0077] [表4]

条件	ｉＰＳ細胞コロニー数					
	レトロネクチン感染			ポリブレン感染		
	ウエル１	ウエル２	ウエル３	ウエル１	ウエル２	ウエル３
Ａ	１３５	１４２	１０８	２２	１７	２３
Ｂ	５４５	５２２	４７５	６２	８３	８０
Ｃ	４２	４３	３６	３４	２６	２６

[0078] 表４に示すように、ｐＤＯＮ５＿ｈＯＫＳＬＮＭは (条件Ｂ）ｐＤＯＮ５- ｈＯＫＳＬＮ（Ｔ２Ａ）(条件Ａ）を超える高い多能性幹細胞の誘導効率を示した。また、ポリプレンによる感染に比べレトロネクチンを用いた方がはるかに効率よく多能性幹細胞を誘導できることが再度確認された。

[0079] 実施例２ 歯周靭帯線維芽細胞と前駆脂肪細胞からのｉＰＳ細胞誘導

ヒト成人皮膚線維芽細胞以外のヒト細胞、ヒト歯周靭帯線維芽細胞 (Ｌｏｎｚａ社製）及びヒト皮下脂肪由来前駆脂肪細胞 (Ｌｏｎｚａ社製）を標的として多能性幹細胞を誘導した。

[0080] （１）レトロウイルスベクターによる遺伝子導入

レトロネクチンの培養プレートへの固定化は、実施例１＿（１）と同様の方法により行った。レトロネクチンによる遺伝子導入は、表３に示すウィルス液Ｂを用い、実施例１＿（２）及び (３）と同様の方法により2回行った。また培地として、歯周靭帯線維芽細胞を培養する際にはＳＣＧＭ培地 (Ｌｏｎｚａ社製ストローマ細胞培地キット)を、前駆脂肪細胞を培養する際にはＰＧＭ＿２培地 (Ｌｏｎｚａ社製前駆脂肪細胞培地キット＿２）を使用した。

[0081] （２）フィーダー細胞上への播種

培養６日目に実施例１_（４）と同様の方法によりフィーダー細胞上に播種し培養を継続した。ただし、遺伝子導入細胞の回収と培養７日目までの培養には、実施例２_（１）と同様にそれぞれに適した培地を使用した。

（３）ｉＰＳ細胞コロニーの計測

培養２８日目に実施例１_（５）と同様の方法によりｉＰＳ細胞コロニー数を計測した。その結果を表５に示す。

[0082] [表5]

	ｉＰＳ細胞コロニー数					
	歯周靭帯線維芽細胞			前駆脂肪細胞		
条件	ウエル１	ウエル２	ウエル３	ウエル１	ウエル２	ウエル３
Ｂ	６５	７０	４７	５	１１	４

[0083] 表５に示すように、ｐＤＯＮ５_ｈＯＫＳＬＮＭとレトロネクチンを用いることで、皮膚線維芽細胞以外にも歯周靭帯線維芽細胞及び前駆脂肪細胞からも多能性幹細胞が誘導できることが明らかとなつた。

[0084] 調製例４　マウスｉＰＳ細胞誘導プラスミドベクターｐＤＯＮ５_ｍＯｃｔ４、ｐＤＯＮ５―ｍＫＩｆ４、ｐＤＯＮ５_ｍＳｏｘ２、ｐＤＯＮ５―ｍｃ-Ｍｙｃの構築

ＲｅｆＳｅｑ　Ａｃｃ．Ｎｏ．ＮＭ―０１３６３３．２（ｍＯｃｔ４遺伝子）、ＮＭ―０１０６３７．３（ｍＫＩｆ４遺伝子）、ＮＭ―０１１４４３．３（ｍＳｏｘ２遺伝子）、ＮＭ_０　１０８４９．４（ｍｃ-Ｍｙｃ遺伝子）の配列情報より、ベクターに導入するための制限酵素認識配列を有する遺伝子増幅用合成プライマーをそれぞれ合成した。ＭｏｕｓｅＥＳ細胞（ＤＳファーマ社製）及びＭｏｕｓｅＳｐｌｅｅｎ細胞よりＴｏｔａＩＲＮＡを調製、ｃＤＮＡを合成し、これを鋳型として各核初期化因子の遺伝子に対応するプライマー対を用いてＰｒｉｍｅＳＴＡＲ（登録商標）　ＧＸＬ　ＤＮＡ　Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ（タカラバイオ社製）によりＰＣＲを行った。鋳型の由来細胞と各核初期化因子の遺伝子の組合わせを表６に示す。反応終了後

、反応液を１．０％アガロースゲル電気泳動に供し、ｍＯｃｔ４遺伝子を含む約１．１ｋｂｐのＤＮＡフラグメント、ｍＫＩｆ４遺伝子を含む約１．５ｋｂｐのＤＮＡフラグメント、ｍＳｏｘ２遺伝子を含む約１．０ｋｂｐのＤＮＡフラグメント、ｍｃ＿Ｍｙｃ遺伝子を含む約１．３ｋｂｐのＤＮＡフラグメントをそれぞれ抽出、精製した。これらのＤＮＡフラグメントを制限酵素により切断し、同じく制限酵素により切断したレトロウイルスベクターｐＤＯＮ-５（タカラバイオ社製） ＤＮＡに挿入して得られたプラスミドベクターを各々ｐＤＯＮ５―ｍＯｃｔ４、ｐＤＯＮ５-ｍＫＩｆ４、ｐＤＯＮ５＿ｍＳｏｘ２、及びｐＤＯＮ５＿ｍｃ＿Ｍｙｃとした。このうち、ｐＤＯＮ５-ｍＯｃｔ４の塩基配列を配列表の配列番号９に示す。

[0085] [表6]

鋳型の由来細胞	核初期化因子の遺伝子
Ｍｏｕｓｅ ＥＳ	ｍＯｃｔ４、ｍＳｏｘ２
Ｍｏｕｓｅ Ｓｐｌｅｅｎ	ｍＫｌｆ４、ｍｃ－Ｍｙｃ

[0086] 調製例５ ２Ａペプチドン連結型マウスｉＰＳ細胞誘導プラスミドベクターｐＤＯＮ５-ｍＯＫＳ、ｐＤＯＮ５＿ｍＯＫＳＭ及びｐＤＯＮ５-ｍＯＫＳＭＯの構築

調製例４の核初期化因子をコードする遺伝子のコード領域由来のＤＮＡフラグメント及び調製例１の２ＡペプチドをコードするＤＮＡフラグメントを用いて、ベクターへのサブクローニング、ＰＣＲ、制限酵素消化、ライゲーションヨン反応を繰り返し、核初期化因子をコードする遺伝子のコード領域及び２ＡペプチドをコードするＤＮＡフラグメントを５'末端からｍＯｃｔ４、Ｔ２Ａ１、ｍＫＩｆ４、Ｔ２Ａ２、及びｍＳｏｘ２の順に含むＤＮＡフラグメントを調製した。このＤＮＡフラグメントをレトロウィルスベクタ_ｐＤＯＮ―５ ＤＮＡに挿入、得られたプラスミドベクターをｐＤＯＮ５-ｍＯＫＳと命名した。プラスミドベクターの挿入ＤＮＡフラグメントの構造を表７に示す。

次に、Ｉｎ―Ｆｕｓｉｏｎ Ａｄｖａｎｔａｇｅ ＰＣＲクローニングキ

ット (クロンテック社製) を用いて、ディレクショナルクローニングにより pDON5_阳0 ペ3 に更に丁2A3 フラグメントとmc_Myc をコードするDNA フラグメント が連結 したpDON5_mOKSMと、pDON5_阳0 ペ3 Mに更に丁2A4 フラグメントとmOct4 をコードするDNA フラグメント が連結 したpDON5_mOKSMO を構築した。構築に使用したプライマー はキット の取扱説明書に従って設計し、線状化ベクターの錶型にはpDON5_阳0 ペ3 及び卩DON5_mOKSMを、挿入遺伝子の錶型には調製例4 で構築したpDON5-mc-Myc及びpDON5_mOct4 を用いた。各プラスミドベクターの挿入DNA フラグメント の構造を表7 に、pDON5_mOKSMの塩基配列を配列表の配列番号10 に示す。

[0087] [表7]

ベクター名	5'末端から連結されるDNAフラグメントの構造
pDON5-mOKS	mOct4、T2A1、mKlf4、T2A2、mSox2
pDON5-mOKSM	mOct4、T2A1、mKlf4、T2A2、mSox2、T2A3、mc-Myc
pDON5-mOKSMO	mOct4、T2A1、mKlf4、T2A2、mSox2、T2A3、mc-Myc、T2A4、mOct4

[0088] 調製例6 マウスiPS細胞誘導プラスミドベクターpDON5_mO_IR—KSMの構築

調製例5 で構築したレトロウィルスベクタ_ pDON5_mOKSMの1箇所のT2A1配列がIRES2の配列に置換されたレトロウイルスベクター—であるpDON5—mO—IR—KSMを構築した。pIRES2—ZsGreen (クロンテック社製) を錶型にPCRでIRES2 フラグメントを増幅、In—Fusion Advantage PCRクローニングキットによりディレクショナルクローニングを行い、pDON5_mO_IR_KSMプラスミドを得た。構築に使用したプライマー はキット の取扱説明書に従って設計し、線状化ベクターの錶型には調製例2 のpDON5_mOKSMを用いた。挿入DNA フラグメント の構造を表8 に、塩基配列を配列表の配列番号11 に示す。

[0089]

ほ 8]

ベクター名	5'末端から連結されるＤＮＡフラグメントの構造
pDON5-mO-IR-KSM	mOct4、IRES2、mKlf4、T2A2、mSox2、T2A3、mc-Myc

[0090] 調製例７　２Ａペプチ ド連結型ヒトｉＰＳ細胞誘導プラスミドベクターｐＤＯＮ５＿ｈＯＫＳ、ｐＤＯＮ５＿ｈＯＫＳＬＮ、ｐＤＯＮ５＿ｈＯＫＳＭ、及びｐＤＯＮ５＿ｈＯＣＴ４の構築

調製例１の核初期化因子をコー ドする遺伝子のコー ド領域由来のＤＮＡフラグメント及び２Ａペプチ ドをコー ドするＤＮＡフラグメントを用いて、ベクターへのサブクローニング、ＰＣＲ、制限酵素消化、ライゲーシヨン反応を繰り返し、核初期化因子をコー ドする遺伝子のコー ド領域及び２Ａペプチ ドをコー ドするＤＮＡフラグメントを５'末端から表９に記載される順に含むＤＮＡフラグメントを調製し、レトロウイルスベクタ＿ｐＤＯＮ―５　ＤＮＡに挿入し、ｐＤＯＮ５＿ｈ０ベ３及び卩ＤＯＮ５-ｈＯＫＳＬＮを調製した。ｐＤＯＮ５＿ｈＯＫＳＬＮの塩基配列を配列表の配列番号１２に示す。

[0091] Ｉｎ―Ｆｕｓｉｏｎ　Ａｄｖａｎｔａｇｅ　ＰＣＲクローニングキットを用いたディレクショナルクローニングにより、前記ｐＤＯＮ５＿ｈＯＫＳに、更にＴ２Ａ４フラグメントとｈｃ＿ＭＹＣをコー ドするＤＮＡフラグメントが連結したｐＤＯＮ５＿ｈＯＫＳＭを構築した。挿入ＤＮＡフラグメントの構造を表９に示す。構築に使用したプライマーはキットの取扱説明書に従つて設計し、錶型にはｐＤＯＮ５＿ト０ペ３及び卩ＤＯＮ５　ＤＮＡにｈｅ＿ＭＹＣをコー ドするＤＮＡフラグメントを挿入したｐＤＯＮ５＿ｈｃ＿ＭＹＣを用いた。ｐＤＯＮ５＿ｈＯＫＳＭの塩基配列を配列表の配列番号１３に示す。

[0092] また、前述のｈＯＣＴ４をコー ドする人工合成ＤＮＡフラグメントを、レトロウィルスベクタ＿ｐＤＯＮ―５　ＤＮＡに挿入し、得られたプラスミドベクターをｐＤＯＮ５＿ｈＯＣＴ４とした。ｐＤＯＮ５＿ｈＯＣＴ４の塩基配列を配列表の配列番号１４に示す。

[0093] [表9]

ベクター名	5'末端から連結されるDNAフラグメントの構造
pDON5-hOKS	hOCT4、T2A1、hKLF4、T2A2、hSOX2
pDON5-hOKSLN	hOCT4、T2A1、hKLF4、T2A2、hSOX2、T2A3、hLIN28、T2A4、hNANOG
pDON5-hOKSM	hOCT4、T2A1、hKLF4、T2A2、hSOX2、T2A4、hc-MYC
pDON5-hOCT4	hOCT4

[0094] 調製例8 レトロウイルスベクターの調製

(1) レトロウイルスベクターの産生

G3T-hi細胞 (タカラバイオ社製)を5X10^{5}cells/mLとなるように10F—DMEM [10%牛胎児血清 (Hyclone社製)、1%ペニシリン/ストレプトマイシン (ナカライテスク社製)含有D—MEM (シグマ社製)] に懸濁し、その4mLを6cmコラーゲンコートディッシュ (イワキ社製)に播種して37℃のCO_2インキュベーターで24時間培養した。

[0095] 500μLのOPTI—MEM (インビトロジェン社製)に10μLのTransIT-293 (タカラバイオ社製)を混合し、室温で5分放置後、2μgのpGPプラスミド (タカラバイオ社製)、1μgのpE—Ecoプラスミド (タカラバイオ社製)又はpE-Amphoプラスミド (タカラバイオ社製)及び2μgの調製例4～7で調製した各組換えプラスミドをそれぞれ加えて混合し、更に15分間室温で放置した。この混合液を上記のG3T-hi細胞に添加して培養を継続し、24時間後に4mLの10F—DMEMに交換した。更に24時間培養を継続した後、ウィルスを含む培地を回収し、0.45μmのフィルターでろ過してレトロウイルスベクターを含むウィルス液を調製した。ウィルス液は調製後すぐに使用しない場合は−80℃で凍結保存して、使用時に解凍して用いた。

[0096] 実施例3 マウス胎児線維芽細胞 (Mouse embryonic fibroblast;MEF)の調製

iPS細胞誘導のための標的細胞としてMEFを調製した。調製は論文記載の方法に従い行った。[Takahashi Kら、ネイチヤープロトコ

ル (Ｎａｔｕｒｅ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌ)、第２巻、３０８１—３０８９頁、２００７年〕

[0097] 実施例４　マウスｉＰＳ細胞の誘導

（１）レトロネクチンの培養プレートへの固定化

ノントリートメント１２穴培養プレート (ベクトン・ディッキンソン社製) の各ゥエルに２５パｇ／ｍＬとなるように、リン酸緩衝水溶液 (ＰＢＳ) で希釈したレトロネクチン (登録商標、タカラバイオ社製) 溶液を１ｍＬずつ添加し、４℃で一晩固定化を行った。その後、各ゥエルより溶液を除去し、１ｍＬのＰＢＳで２回洗浄の後、各実験に供するまで４℃で保存した。

[0098] （２）レトロウイルスベクターによる遺伝子導入

調製例８で調製したレトロウイルスベクターを含むウィルス液を、以下の表１０の条件Ａ〜Ｊの組合せで等量ずつ混合し、更にこの混合液に各ウィルス液と等量の蛍光タンパク質搭載レトロウイルスベクター液を混合後、１０Ｆ_ＤＭＥＭ培地で２倍に希釈した。実施例４_ （１）で調製したレトロネクチン固定化培養プレートの各ゥエルにそれぞれ１ｍＬずつ添加し、３２℃、２，０００ｘｇで２時間遠心した。

[0099] その後、各ゥエルより上清を除去して１．５％ＨＳＡ (Ｈｕｍａｎ　Ｓｅｒｕｍ　Ａｌｂｕｍｉｎ) を含むＰＢＳで１回洗浄後、４ｘ１０^{4}ｃｅｌｌｓ／ｍＬとなるように１０Ｆ_ＤＭＥＭで懸濁した実施例３のＭＥＦを１ｍＬずつ各ゥエルに播種した。播種後はプレートを３７℃のＣＯ$_{2}$インキュベーターで培養を開始した (培養０日目)。なお、培養１日目、３日目に培地交換を行った。

[0100] （３）フィーダー細胞上への播種

６穴培養プレート (コーニング社製) に終濃度１ｍｇ／ｍＬのゼラチン (シグマ社製) 水溶液を添加し室温１時間あるいは４℃で一晩固定化後、洗浄してゼラチン固定化シャーレを作成した。ここに終濃度１２〃ｇ／ｍＬのマイトマイシンＣ (ナカライテスク社製) で処理したＳＮＬ７６／７細胞 (ＤＳファーマ社製) をプレート1枚当たり1ｘ１０^{6}ｃｅｌｌｓずつ播種し、３

7℃のCO_2インキュベーターで終夜培養することによりフィーダー細胞を調製した。

[01 01] 実施例4_（2）で作製した培養4日目の遺伝子導入細胞を回収し、表の条件A、B、D、F、H、I、Jは5xl0^{3}cells／mLとなるように10F_DMEMに懸濁、条件C、E、Gは1.5xl0^{3}cells／mLとなるように10F_DMEMに懸濁した。この懸濁液2mLを前記のフィーダー細胞上に播種し、培養を継続した。播種翌日に培養上清を除去し、マウスES細胞用培地［85% ノックアウトDMEM（インビトロジェン社製）、15%ノックアウト血清リプレースメント（インビトロジェン社製）、1X非必須アミノ酸混合物（LONZA社製）、1mM ピルビン酸ナトリウム（LONZA社製）、2mM L—グルタミン（LONZA社製）、100μM 2_メルカプトエタノール（インビトロジェン社製）］を2mL添加し、培養28日目まで培養を継続した。この間、1〜2日おきに培地を交換した。

[01 02] （4）iPS細胞コロニーの計測

培養28日目に各条件のiPS細胞コロニー数を、マウスES細胞と類似した形態的特徴を持ち、蛍光タンパク質が陰性で、アルカリホスファターゼが陽性であることを指標に計測した。その結果を表10に示す。

[01 03]

ほ 10]

条件	ベクター名	コロニー数 (n=3 の平均値)	播種細胞数 (cells)	誘導効率 (%)
A	pD0N5-m0ct4 pD0N5-mKlf4 pD0N5-mSox2 pD0N5—me¨Myc	7.33	IxlO 4	0.07%
B	pDON5-mOKSM	0.67	IxlO 4	0.01%
C	pDON5-mOKSM pDON5-mOct4	30.33	3x10³	1.01%
D	pDON5-mOKSMO	0.00	1x10⁴	0.00%
E	pD0N5-m0KSM0 pD0N5-ra0ct4	1.33	3χ10³	0.04%
F	pD0N5-mO-IR-KSM	8.33	IxlO 4	0.08%
G	pDONS-mO-IR-KSM pD0N5¨m0ct4	35.67	3x1 が	1.19%
H	pDON5-mO-IR-KSM pD0N5¨mKlf4	6.33	IxlO 4	0.06%
I	pD0N5-m0-IR-KSM pD0N5-mSox2	4.33	IxlO 4	0.04%
J	pDON5-m0-IR-KSM pDONSic— Myc	3.33	IxlO 4	0.03%

[0104] 表10の条件A、B、Cが示すように、4因子をそれぞれ単独で搭載したレトロウイルスベクターから誘導するよりも、4因子を2Aペプチドで結合し搭載したレトロウィルスベクターは誘導効率が極めて低かったが、ここにmOct4を単独で搭載するレトロウイルスベクターを混合することで誘導効率は飛躍的に上昇することがわかった。

一方、条件Dのように4因子+mOct4を2Aペプチドでつないで搭載したレトロウイルスベクターでは誘導効率は極めて低く、単純にOct4の発現量を増加しただけでは誘導効率は向上しないことがわかった。

また、条件Fが示すようにmOct4とmKlf4の間を2AペプチドからiRESに変更し搭載したベクターを用いると、すべて2Aペプチドでつないで搭載したBの条件よりも約8倍効率的であることがわかった。一般的に、iRESより下流の因子は上流よりも翻訳効率が落ちることが知られているため、iRESより下流の誘導因子 (mKlf4、mSox2、mc

-Ｍｙｃ）のいずれかの強発現がｉＰＳ細胞の誘導に負の影響を与えているためであると考えられた。また、Ｆの条件にｍＯｃｔ４単独搭載レトロウイルスベクターを追加する条件Ｇで、誘導効率は飛躍的に上昇することがわかった。

以上のことから、ｍＯｃｔ４とｍＫＩｆ４をコードするＤＮＡフラグメントの間をＩＲＥＳでつなぐことで、単一ベクターからのｉＰＳ細胞誘導用効率を飛躍的に高めることができることを示した。加えて、ｍＯｃｔ４を単独で搭載するレトロウィルスベクターを別途追加することにより、更に飛躍的にｉＰＳ細胞誘導効率が上昇することが明らかとなった。

[0105] 実施例５　マウス；ＰＳ細胞クローンの樹立

実施例４の条件Ｇ（ｐＤＯＮ５＿ｍＯ＿ＩＲ＿ＫＳＭ、ｐＤＯＮ５-ｍＯｃｔ４）から誘導したｉＰＳ細胞コロニーをピックアップし、各種アツセィに用いるためのｉＰＳ細胞クローンを作製した。

[0106] （１）ｉＰＳ細胞の誘導

実施例４＿（１）、（2）、（３）と同様の方法によりｉＰＳ細胞を誘導した。

[0107] （２）ピックアップ

培養２１日目の培養容器上に形成されたｉＰＳ細胞コロニーを実体顕微鏡（ＳＺ６１；ＯＬＹＭＰＵＳ社製）下でピックアップした。ピックアップしたｉＰＳ細胞コロニーを、あらかじめ０．２５％ｔｒｙｐｓｉｎ-ＥＤＴＡ溶液を１００〃Ｌ添加した９６ゥエルプレートに移し、３７℃で５分間インキュベート後に数回ピペッティングを行ってｉＰＳ細胞懸濁液を調製した。マイトマイシン処理済みのＳＮＬ７６／７細胞を１ゥエル当たり5．４ｘ１０^{4}ｃｅｌｌｓずつ播種した２４ゥエルプレート（コーニング社製）を調製し、ここに前記のｉＰＳ細胞懸濁液全量を接種して継代を行った。継代時には、細胞の剥離を防ぐためにＥＳ細胞用ＦＢＳ（インビトロジェン社製）を１０％になるように培養液中に添加した。継代後は毎日培地交換を行い、十分に増殖したｉＰＳ細胞を随時継代してｉＰＳ細胞クローンを樹立した。

[01 08] 実施例6　マウスＥＳ細胞マーカー遺伝子の発現確認

実施例5で樹立された各ｉＰＳ細胞クローンがマウスＥＳ細胞のマ_カ_遺伝子を発現しているかどうかをＲＴ―ＰＣＲにより確認した。なお、陽性コントロールとしてマウスＥＳ細胞を用いた。

[01 09] （1）ＲＮＡ抽出

6穴培養プレートで培養した各ｉＰＳ細胞クローンから、ＦａｓｔＰｕｒｅ（登録商標）ＲＮＡ　Ｋｉｔ（タカラバイオ社製）によりＴｏｔａｌＲＮＡを回収した。方法はＫｉｔに添付の培養細胞からのＴｏｔａｌＲＮＡ抽出のプロトコルに従った。

[01 10] （2）ｃＤＮＡ合成

実施例6_（1）で抽出したＴｏｔａｌＲＮＡを錶型として、ｃＤＮＡの合成を行った。ＰｒｉｍｅＳｃｒｉｐｔ（登録商標）ＲＴ　ｒｅａｇｅｎｔ　Ｋｉｔ（Ｐｅｒｆｅｃｔ　ＲｅａｌＴｉｍｅ）（タカラバイオ社製）を用い、ＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ　Ａｓｓａｙの場合のプロトコルに従ってプレミックスを調製し、ＴｏｔａｌＲＮＡを２００ｎｇ添加した。ＴａＫａＲａ　ＰＣＲ　Ｔｈｅｒｍａｌ　Ｃｙｃｌｅｒ　Ｄｉｃｅ　Ｇｒａｄｉｅｎｔ（タカラバイオ社製）を用いて３７℃で１５分、８５℃で5秒の反応を行い、ｃＤＮＡを得た。

[01 11] （3）ＰＣＲ反応

まず、表１１に記載の塩基配列を有する合成プライマーの塩基配列を有する合成プライマーをＤＮＡ合成機で合成し、常法により精製した。

[01 12]

[表11]

マーカー遺伝子	プライマー名	配列表の配列番号
Rex1	mRex1-FP	15
	mRex1-RP	16
Oct4	mOCT4endo-FP	17
	mOCT4endo-RP	18
Fbx15	mFbx15-FP	19
	mFbx15-RP	20
Nanog	mNanog-FP	21
	mNanog-RP	22
Gapdh	mGapdh-FP	23
	mGapdh-RP	24

[0113] 実施例6_（2）で得られたcDNAのうちTotaIRNA量に換算して10ng分を錶型としてPCRを行った。5〃Lの5xPrimeSTAR GXL Buffer、2μLのdNTP Mixture（2.5mM each）（タカラバイオ社製）、5pmolのフォワードプライマー、5pmolのリバースプライマー、0.5〃LのPrimeSTAR GXL DNA Polymerase（1.25U/μL）を加え、滅菌蒸留水を加えて全量を25リLとした。前記反応液をTaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Gradientにセットし、98℃で10秒、60℃で15秒、68℃で15秒を1サイクルとし、Fbx15の検出時は35サイクル、その他の遺伝子転写産物の検出時には30サイクルの反応を行った。

[0114] （4）アガロースゲル電気泳動による確認

反応終了後、該反応液5パ$_1$を2.0%アガロースゲル電気泳動に供し、ES細胞マーカー遺伝子のmRNAに由来する増幅産物を確認した。iPS細胞クローン1〜8の結果を図1に示す。図1から明らかなように、元のマウス胎児線維芽細胞 (図中に示すMEF）では確認されない各ES細胞マーカーの発現が、iPS細胞クローンならびにマウスES細胞で確認された。すなわち、樹立された ;PS細胞クローンはES細胞と同様の遺伝子発現パターンを示していることが確認された。

[0115] 実施例７　ＳＳＥＡ―１（Ｓｔａｇｅ―ｓｐｅｃｉｆｉｃ　ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ　ａｎｔｉｇｅｎ-１）細胞表面マーカーの発現確認

実施例５で樹立されたｉＰＳ細胞クローンがＥＳ細胞の細胞表面マーカーを発現しているかどうかを免疫染色により確認した。

[0116] （１）ｉＰＳ細胞の固定

２４ウェルプレートで培養したｉＰＳ細胞クローンを含む各ウェルをＰＢＳで２回洗浄した。その後、４％パラホルムアルデヒド溶液（和光純薬社製）を各ウェルに添加し、室温で１０分間インキュベートした。インキュベート後、ＰＢＳで２回洗浄を行い、固定液を完全に除去した。

[0117] （２）一次抗体反応

１％ＢＳＡ（Ｂｏｖｉｎｅ　Ｓｅｒｕｍ　Ａｌｂｕｍｉｎ）を含むＰＢＳを各ウェルに添加し、室温で一時間インキュベートすることでブロッキング反応を行った。ブロッキング溶液を除去したのち、抗ＳＳＥＡ＿１　マウスＩｇＭ抗体（Ｒ＆Ｄシステム社製）を１％ＢＳＡを含むＰＢＳで５０倍に希釈した溶液を添加し、４℃で一晩インキュベートを行った。

[0118] （３）二次抗体反応

翌日、各ウェルをＰＢＳで３回洗浄後、二次抗体としてＡｌｅｘａ４８８結合抗マウスＩｇＭ抗体（インビトロジェン社製）をブロッキング溶液で１０００倍希釈した溶液を添加した。その後、４℃で一晩インキュベートを行った。翌日、ＰＢＳで３回洗浄後、蛍光顕微鏡にて検鏡・写真撮影を行った。その結果を図２に示す。図２に示すように、樹立された ;ＰＳ細胞クローンは細胞表面全体が蛍光標識され、マウスＥＳ細胞の表面マーカーであるＳＳＥＡ-１を細胞表面に発現していることが示された。

[0119] 実施例８　ｉｎ ｖｉｖｏにおけるｉＰＳ細胞クローンの多分化能の評価

実施例５で樹立されたｉＰＳ細胞クローンがマウスＥＳ細胞と同様に多分化能を持つことを確認するため、ＳＣＩＤマウスに皮下移植しテラトーマ形成能について評価した。

[0120] （１）ｉＰＳ細胞懸濁液の作製

培養したｉＰＳ細胞を０．２５％　Ｔｒｙｐｓｉｎ―ＥＤＴＡを用いて回収し、５ｘＩ０^{6}ｃｅｌｌｓ／ｍＬになるように調製した。

[0121] （２）ｉＰＳ細胞懸濁液のＳＣＩＤマウスへの皮下投与

実施例８＿（１）で調製したｉＰＳ細胞懸濁液をＳＣＩＤマウスの皮下に５ｘ１０^{5}ｃｅｌｌｓ／１００μＬで投与した。

[0122] （３）形成されたテラトーマの凍結切片作製

ｉＰＳ細胞を投与後、５週目に剖検を行いＳＣＩＤマウスからテラトーマを取り出し、ＴＩＳＳＵＥ　ＭＯＵＮＴ（千葉メディカル社製）で包埋して凍結ブロックを作成した。凍結ブロックは使用まで－８０℃に保存した。クライォスタットを用いて凍結切片を作製し、標準的な方法でＨＥ染色後、検鏡を行った。図３に示すように、三胚葉［外胚葉（Ｅｃｔｏｄｅｒｍ）、内胚様（Ｅｎｄｏｄｅｒｍ）、中胚様（Ｍｅｓｏｄｅｒｍ）］由来の組織が観察できたことから、実施例４の条件Ｇ（ｐＤＯＮ５-ｍＯ-ＩＲ＿ＫＳＭ、ｐＤＯＮ５-ｍＯｃｔ４）から樹立したｉＰＳ細胞クローンは多分化能を持つと評価することができた。

[0123] 実施例９　ＯＣＴ４単独搭載レトロウイルスベクター追加効果の検証

ＯＣＴ４単独搭載レトロウィルスベクター追加効果を更に検証するため、ヒト線維芽細胞を用いてｉＰＳ細胞誘導を行った。なお、核初期化因子としてはｈＯＣＴ４、ｈＳＯＸ２、ｈＫＬＦ４、ｈｃ＿ＭＹＣの４因子の組合せ、及びｈｃ＿ＭＹＣを含まないｈＯＣＴ４、ｈＳＯＸ２、ｈＫＬＦ４、ｈＬＩＮ２８、ｈＮＡＮＯＧの５因子の組合せ、について検討を行った。

[0124] （１）レトロネクチンの培養プレートへの固定化

実施例４＿（１）と同様の方法で行った。

[0125] （２）レトロウイルスベクターによる遺伝子導入

調製例８で調製した各ウィルス液を、以下の表１２の条件Ａ～Ｄの組合せで等量ずつ混合し、更に１０Ｆ―ＤＭＥＭで３０倍希釈した。このウィルス溶液をレトロネクチン固定化培養プレートの各ウエルにそれぞれ添加し、３２℃、２，０００Ｘｇで２時間遠心した。

[01 26] その後、各ウエルより上清を除去して１．５％ＨＳＡを含むＰＢＳで１回洗浄後、４ｘ１０^{4}ｃｅｌｌｓ／ｍＬとなるように１０Ｆ—ＤＭＥＭで懸濁したヒト皮膚線維芽細胞を１ｍＬずつ各ウエルに播種した。播種後はプレートを３７℃のＣ０$_{2}$インキュベーターで培養を開始した (培養０日目)。なお、培養１日目、３日目には培地交換を行った。

[01 27] （３）フィーダー細胞上への播種

６穴培養プレート (コーニング社製)に終濃度１ｍｇ／ｍＬのゼラチン (シグマ社製)水溶液を添加し、室温１時間あるいは４℃で一晩固定化後、洗浄してゼラチン固定化シャーレを作成した。ここに終濃度１２〃ｇ／ｍＬのマイトマイシンＣ (ナカライテスク社製)で処理したＳＮＬ７６／７細胞をプレート1枚当たり1ｘ１０^{6}ｃｅｌｌｓずつ播種し、３７°○の○０$_{2}$インキュベーター—で終夜培養することによりフィーダー細胞を調製した。

[01 28] 実施例９_（２）で作製した培養６日目の遺伝子導入細胞を回収し、５Ｘ１０^{3}ｃｅｌｌｓ／ｍＬとなるように１０Ｆ—ＤＭＥＭに懸濁した。この懸濁液２ｍＬを前記のフィーダー細胞上に播種し、培養を継続した。播種翌日に培養上清を除去し、ヒトＥＳ細胞用培地 (８０％ ＤＭＥＭ／Ｆ１２ (インビトロジェン社製)、２０％ノックアウト血清リプレースメント、１ｘ非必須アミノ酸混合物、２ｍＭ Ｌ—グルタミン、１００〃Ｍ ２_メルカプトエタノール、４ｎｇ／ｍＬ ｂＦＧＦ (和光純薬社製))を２ｍＬ添加し、培養２８日目まで培養を継続した。この間、１〜２日おきに培地を交換した。

[01 29] （４）ｉＰＳ細胞コロニーの計測

培養２８日目に各条件のヒトｉＰＳ細胞コロニー数を形態的特徴、アルカリホスファターゼ陽性であることを指標に計測した。その結果を表１２に示す。

[01 30]

ほ 12]

条件	ベクター名	コロニー数 (n=3の平均値)	誘導効率 (%)
A	pDON5-hOKSM	22.7	0.06
B	pDON5-hOKSM pDON5-hOCT4	266.0	0.67
C	pDON5-hOKSLN	15.3	0.04
D	pDON5-hOKSLN pDON5-hOCT4	26.3	0.07

[01 31] 表１２に示すように、ｈＯＣＴ４、ｈＳＯＸ２、ｈＫＬＦ４、ｈｃ＿ＭＹＣの４因子の組合せ、及びｈｃ—ＭＹＣを含まないｈＯＣＴ４、ｈＳＯＸ２、ｈＫＬＦ４、ｈＬＩＮ２８、ｈＮＡＮＯＧの５因子の組合せのいずれの場合においてもＯＣＴ４を単独で搭載するレトロウイルスベクターを追加すると誘導効率が飛躍的に向上することがわかった。

産業上の利用可能性

[01 32] 本発明により、多能性幹細胞を効率よく製造するための核酸群及びベクター群が提供される。当該核酸群及びベクター群は、多能性幹細胞を効率よくかつ安全に製造する方法に使用され、基礎研究、医療への応用研究分野において極めて有用である。

配列表フリー-テキスト

[01 33] SEQ ID NO:1 T2A peptide fragment

SEQ ID NO:2 Nucleotide sequence of T2A1 DNA fragment

SEQ ID NO:3 Nucleotide sequence of T2A2 DNA fragment

SEQ ID NO:4 Nucleotide sequence of T2A3 DNA fragment

SEQ ID NO:5 Nucleotide sequence of T2A4 DNA fragment

SEQ ID NO:6 P2A peptide fragment

SEQ ID NO:7 Nucleotide sequence of P2A DNA fragment

SEQ ID NO:8 Nucleotide sequence of pD0N5-hOKSLNM insertion fragment

SEQ ID NO:9 Nucleotide sequence of pD0N5-m0ct4

SEQ ID NO:10 Nucleotide sequence of pD0N5-m0KSM

SEQ ID NO:11:Nucleotide sequence R-K

12: cl ot of pDON5-hOKSLN

SEQ ID NO:13:Nucleotide sequence pD 5

EQ 14 eot ɔ CT4

SEQ ID NO:15:mRex1-FP primer

SEQ ID NO:16:mRex1-RP primer

SEQ ID NO:17:mOCT4endo-FP primer

EQ I NO 8: T4 R me

SEQ ID NO:19:mFbx15-FP primer

2 Fbx15-RP me

2 \ F me

22 -R me

EQ I F me

EQ I 24 Gaɔ ɳ R me

請求の範囲

[請求項1] 相互に自己切断ペプチドをコードする配列を介して接続されたＯＣＴ４、ＫＬＦ４、ＳＯＸ２、ＬＩＮ２８、ＮＡＮＯＧ及びＭＹＣファミリーに属するタンパク質の６種の核初期化因子をコードする遺伝子のコード領域を含む核酸。

[請求項2] ５'末端より順にＯＣＴ４、ＫＬＦ４、ＳＯＸ２、ＬＩＮ２８、ＮＡＮＯＧ、ＭＹＣフアミリーに属するタンパク質のそれぞれの遺伝子のコード領域が並んで配置されている請求項１記載の核酸。

[請求項3] 請求項１又は２に記載の核酸を含むベクター。

[請求項4] （１）ＯＣＴ４、ＫＬＦ４、ＳＯＸ２、ＬＩＮ２８、ＮＡＮＯＧ及びＭＹＣファミリーに属するタンパク質からなる群より選択される少なくとも３種の核初期化因子をコードする遺伝子のコード領域を１つの分子内に含む核酸、及び
（２）ＯＣＴ４をコードする遺伝子のコード領域を含む他の核酸、
を含む核酸のセット。

[請求項5] （１）の核酸が、少なくとも３種の核初期化因子をコードする遺伝子のコード領域が、自己切断ペプチドをコードする配列及びＩＲＥＳ（ｉｎｔｅｒｎａｌ ｒｉｂｏｓｏｍａｌ ｅｎｔｒｙ ｓｉｔｅ）配列から選択される配列を介して相互に接続された核酸である、請求項４に記載の核酸のセット。

[請求項6] （１）の核酸において、少なくとも３種の核初期化因子をコードする遺伝子のコード領域のうち、５'末端の２種のコード領域が順にＯＣＴ４、ＫＬＦ４をコードする遺伝子のコード領域であり、それらがＩＲＥＳ配列を介して接続されている、請求項４又は５に記載の核酸のセット。

[請求項7] 請求項４～６のいずれか１項に記載の核酸のセットを構成する核酸をそれぞれ含む２種のベクターからなるベクターのセット。

[請求項8] 請求項１に記載の核酸又は請求項４に記載の核酸のセットを含む細

胞。

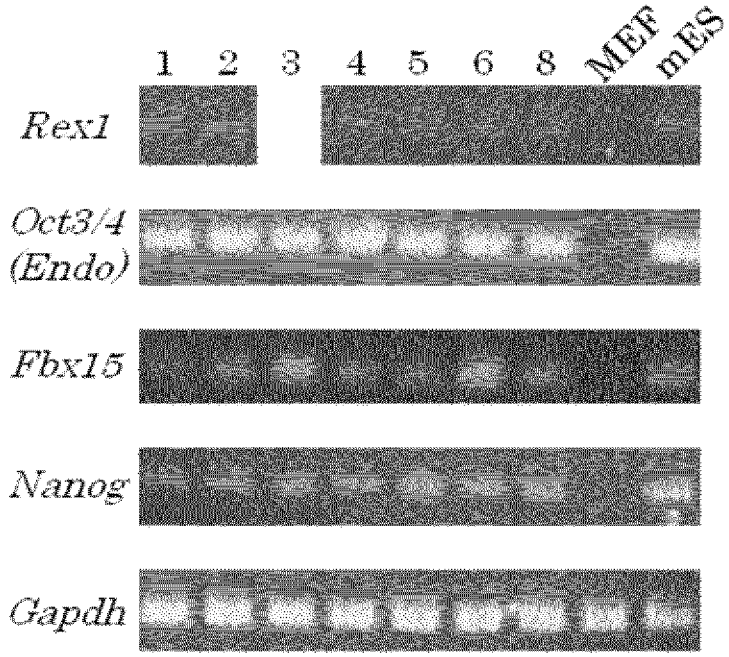
[請求項9] 体細胞に請求項1に記載の核酸又は請求項4に記載の核酸のセットを導入する工程を包含することを特徴とする、多能性幹細胞の製造方法。

[請求項10] ベクターを使用して核酸又は核酸のセットを体細胞に導入する請求項9記載の多能性幹細胞の製造方法。

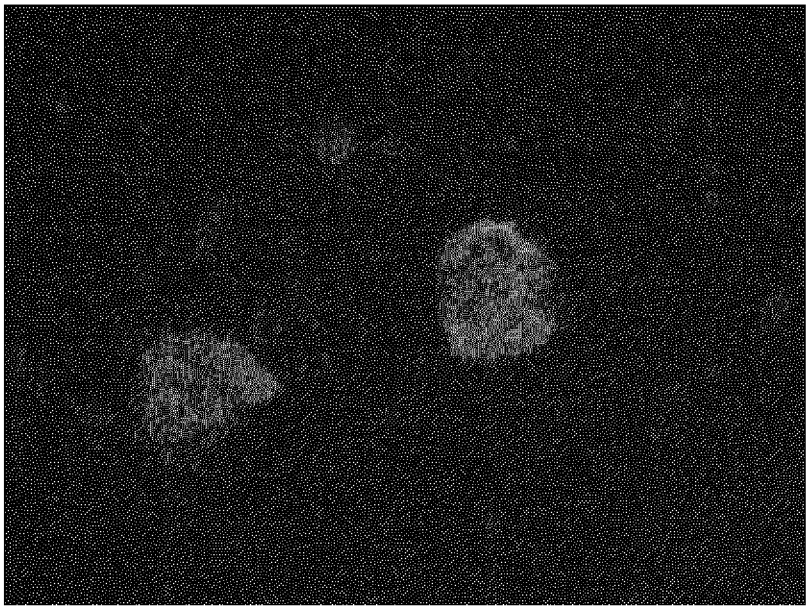
[請求項11] 核酸又は核酸のセットを導入する工程がフイブロネクチン又はフィブロネクチンフラグメントの存在下に実施される請求項9記載の方法。

[請求項12] 体細胞に請求項3に記載のベクター又は請求項7に記載のベクターのセットを導入して多能性幹細胞を製造する工程、及び前記の多能性幹細胞の分化を誘導する工程、を包含することを特徴とする、分化細胞の製造方法。

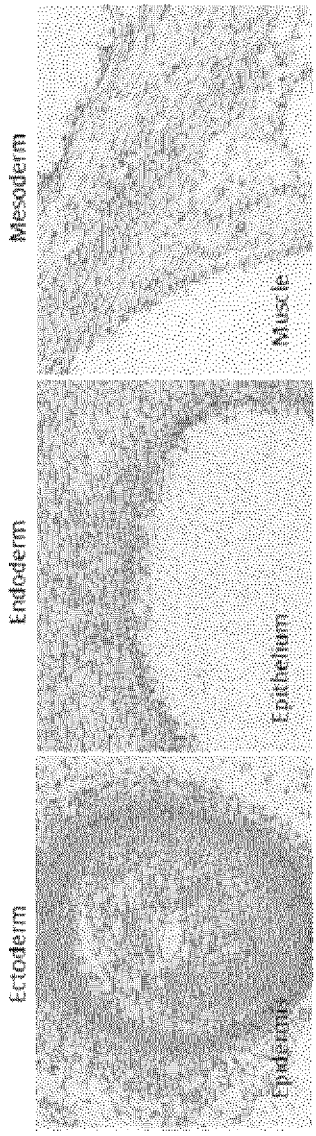
[図1]



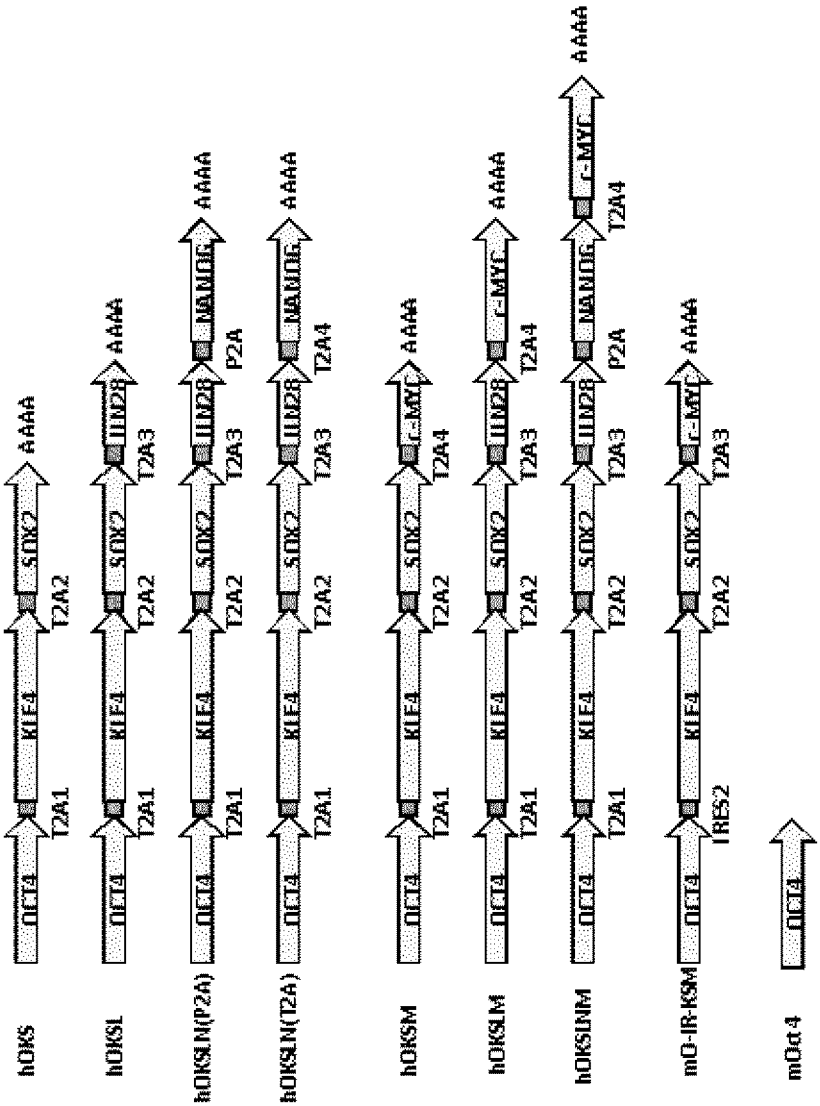
[図2]



[図3]



[図4]


hOKS
hOKSL
hOKSLM(P2A)
hOKSLM(T2A)
hOKSM
hOKSLM
hOKSLNM
mO-IR-KSM
mOct4
OCT4
KLF4
SOX2
T2A1
T2A2
T2A3
T2A4
IRES2
LIN28
NANOG
P2A
c-MYC
AAAA

Y

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2011/061311

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N1 5/09 (2006.01)i, C12N5/1 0(2006.01)i, A61K35/12(2006.01)n, A61P43/00 (2006.01)n, C07K1 9/00 (2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N1 5/09, C12N5/10, A61K3 5/12, A61P43/00, C07K19/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2011
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2011 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2011

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JST Plus / JMEDPlus / JST7580 (JDreaml l), PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010/030003 Al (Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.), 18 March 2010 (18.03.2010), claims; paragraphs [0022], [0023], [0032] to [0036], [0045]; examples 1, 2; fig. 1 (Family: none)	4-10,12 1-3,11
Y	WO 2010/008054 Al (Dnavec Corp.), 21 January 2010 (21.01.2010), paragraph [0062] & CA 2731007 A	1-3
Y	WO 2010/004989 Al (Takara Bio Inc.), 14 January 2010 (14.01.2010), paragraphs [0021] to [0023], [0051] to [0062] & EP 2295538 Al	11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibnion or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying tiie invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
11 August, 2011 (11.08.11)	23 August, 2011 (23.08.11)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

国際調査報告

国際出願番号 PCT／JP2011／061311

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/09 (2006.01) i, C12N5/10 (2006.01) i, A61K35/12 (2006.01) n, A61P43/00 (2006.01) n, C07K19/00 (2006.01) n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/09, C12N5/10, A61K35/12, A61P43/00, C07K19/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922－
日本国公開実用新案公報 1971－2
日本国実用新案登録公報 1996－
日本国登録実用新案公報 1994－2

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (jDreamII), PubMed

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	WO 2010/030003 A1 (協和発酵キリン株式会社) 2010.03.18 特許請求の範囲、[0022], [0023], [0032]-[0036], [0045], 実施例1及び2、図1 (ファミリーなし)	4-10, 12
Y		1-3, 11
Y	WO 2010/008054 A1 (ディナベック株式会社) 2010.01.21 [0062] 段落 & CA 2731007 A	1-3

☑ c欄の続きにも文献が列挙されている。

□ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
11.08.2011	23.08.2011

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA／JP)
郵便番号100—8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員) 4B 9453
上條 肇
電話番号 03-3581-1101 内線 3448

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y	Wo 2010/004989　A1（タカラバイオ株式会社）2010. 01. 14 [0021] - [0023]，[0051] - [0062] 段落 & EP 2295538　A1	11